

SÉRIE A, N° 681

N° D'ORDRE

1437

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Henry PÉNAU

1^{re} THÈSE : Contribution à la cytologie de quelques microorganismes.

2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 Novembre 1911, devant la Commission d'examen.

MM. PRUVOT Président.

MATRUCHOT

MICHEL } Examinateurs.

LILLE

IMPRIMERIE LE BIGOT FRÈRES

25, rue Nicolas-Leblanc, 25

1911

SÉRIE A, N° 681
N° D'ORDRE
1437

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

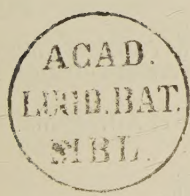
PAR

Henry PÉNAU

- 1^{re} THÈSE : Contribution à la cytologie de quelques microorganismes.
- 2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 12 Novembre 1911, devant la Commission d'examen.

MM. PRUVOT . . .	Président.
MATRUCHOT . . .	} Examineurs.
MICHEL . . .	



LILLE
IMPRIMERIE LE BIGOT FRÈRES
25, rue Nicolas-Leblanc, 25
1911

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen. P. APPELL, Professeur. Mécanique rationnelle.

Doyen honoraire . . . G. DARBOUX . . . Géométrie supérieure.

Profess. honoraires. } Ch. WOLF.
J. BIRAN.

J. RIBAN.

LIPPMANN Physique.

BOUTY Physique.

BOUSSINESQ. Physique mathématique et Calcul
des probabilités.

PICARD	Analyse supér. et Algèbre supér.
H. POINCARÉ	Astronomie mathématique et Méca- nique céleste.

Yves DELAGE Zoologie, Anatomie, Physiologie comparées.

Gaston BONNIER . . . Botanique.

DASTRE Physiologie.

KOENIGS Mécanique physique et expériment.

VÉLAIN Géographie physique.

GOUSAT. Calcul différentiel et Calcul intégral.

CHATIN. Histologie.

HALLER Chimie organique.

JOANNIS Chimie (Enseignement P. C. N.).

JANET Physique »

WALLERANT Minéralogie.

ANDOYER. Astronomie physique.

PAINLEVÉ Mathématiques-générales.

HAUG Géologie.

HOUSSAY Zoologie.

H. LE CHATELIER, . . . Chimie.

Gabriel BERTRAND . . . Chimie

M^{me} P. CURIE. Physique générale

CAULLERY	Zoologie (Evolut. de
--------------------	----------------------

C. CHABRIÉ Chimie appliquée.

G. GUARDINI.	Géométrie appliquée.
G. URBAIN.	Chimie.

E. BOREL,	Théorie
---------------------	---------

MARCHIS Aviation.

Jean PERRIN, . . . Chimie p

G. PRUVOT. Zoologie, Anatomie, Physiologie comparées.

N. Applicat. de l'Analyse à la géométrie.

N. Calcul différentiel et Calcul intégral.

PUISEUX Mécanique et Astronomie.

LELUC Physique.

MATRUCHOT. Botanique.

MICHEL Minéralogie.

HÉROUARD Zoologie.

Léon BERTRAND Géologie.

Rémy PERRIER . . . Zoologie

MOLLIARD Physiologie végétale.

COTTON Physique.

Secrétaire. D. TOMBECK.

INTRODUCTION

Les questions relatives à la cytologie des Bactériacées ont une portée considérable, tant au point de vue biologique que systématique. Ces organismes, en effet, malgré une morphologie externe fort simple, présentent une structure intime excessivement complexe. La présence d'une coque cellulosique et, par suite, d'un protoplasme dépourvu de plasticité comme celui des amibes, l'absence de corpuscules chlorophylliens, leur existence saprophytique, font que la physiologie de ces organismes se trouve réduite à son minimum de complexité. Ils se nourrissent, en effet, par intussusception et se reproduisent par spore, suivant un mécanisme excessivement simple. L'étude des champignons inférieurs et des Bactériacées, questions concomitantes, devrait être considérée comme la véritable introduction aux questions de cytobiologie générale. Il est en effet difficile d'aborder avec fruit l'étude des Amibes ou des Ciliés sans connaître, à fond, la structure de ces microorganismes plus dégradés. Les Amibes, que l'on considère comme les êtres les plus simples de la systématique zoologique, présentent une morphologie interne nécessairement plus complexe, puisque, dépourvus de membranes, ils poussent des pseudopodes et se nourrissent par phagocytose de particules alimentaires. Il s'ensuit nécessairement que certaines enclaves de leur cytoplasme seront constituées soit par des débris d'aliments, soit par des parasites étrangers; les premiers prendront le Neutralroth, les seconds seront dépourvus d'affinité pour ce colorant, tous deux fixeront, dans certains cas pourtant, les teintures basiques. Il est fort possible que les chromidies, qui ont été décrites chez un grand nombre de Protozoaires, n'aient pas d'autre origine. Quant aux algues, la présence de la chlorophylle rend nécessairement leur étude plus délicate, puisque ce pigment contribue à l'édification de substances de réserve plus ou moins

complexes. Malgré leur existence saprophytique, malgré leur place, très peu élevée dans la systématique, les champignons inférieurs et les Bactéries présentent cependant une structure fine et délicate, comme nous le verrons par la suite.

Le début de nos recherches a porté sur *Endomyces albicans*. Nous voulions retrouver dans ce champignon les formations cytologiques, décrites par Guilliermond, dans les Levures ou les organismes à forme levure. Colorant à l'hématoxyline au fer, nous fûmes surpris de ne pas retrouver le noyau vésiculeux décrit par Guilliermond, dans cet organisme. Notre attention fut au contraire vivement attirée par la présence d'une formation basophile très nette, qui nous fit penser qu'il existait peut-être chez ce champignon, un véritable chromidium, analogue à celui décrit par Hertwig chez certains Protozoaires. Le fait nous paraissait d'autant plus probant qu'un certain nombre d'observateurs avaient déjà décrit chez les levures, des formes nucléaires plus ou moins diffuses, et qui se rapprochaient, par suite, de notre chromidium. Les autres teintures nucléaires employées, violet de gentiane et bleu polychrome, mettaient en évidence des aspects identiques, tandis que le bleu de Unna permettait, en outre, d'observer avec netteté les corpuscules métachromatiques. Le renom et la compétence acquis par Guilliermond en myco-cytologie nous mit en garde contre nos propres observations, puisqu'il fallait admettre, ou bien que la formation basophile avait échappé au savant lyonnais, ou qu'une technique insuffisante nous empêchait de mettre en évidence le noyau d'*Endomyces albicans*. Devant la difficulté du problème, et sur les conseils du docteur Pierre Vigier, préparateur d'histologie à la Sorbonne, nous nous servîmes de l'hématéine, qui nous avait cependant donné des résultats très imparfaits au début de notre travail. Les fixations et les colorations des levures sont en effet de réalisation délicate; la complexité de leur structure permet d'expliquer le nombre considérable de résultats contradictoires publiés sur ces organismes. Les colorations à l'hématéine, en particulier, exigent une technique spéciale qui permet de mettre en évidence le noyau, et cet organite là seulement, à l'exclusion des deux autres formations cytoplasmiques : reticulum basophile et corpuscules métachromatiques. La cytologie de la forme levure ayant été élucidée, nous avons entrepris, avec les mêmes procédés, l'étude des formes

filamenteuses de ce microorganisme, et avons retrouvé et décrit des structures identiques.

Abandonnant l'étude de ce champignon, nous nous sommes ensuite consacré à la cytologie d'un certain nombre de Bactériacées. Nous voulions nous rendre compte, si la triple formation cytoplasmique d'*Endomyces* n'existerait pas également chez ces microorganismes. Les observateurs qui ont étudié la cytologie des Bactériacées étaient partagés en trois camps. D'un côté, les partisans de la théorie chromidiale, de l'autre, ceux de la théorie d'un noyau morphologiquement défini; enfin, une troisième catégorie d'observateurs admettait simultanément la présence d'un noyau et d'un chromidium dans la cellule de certaines Bactériacées. Les difficultés que nous avons éprouvées dans l'étude d'*Endomyces* nous préparaient admirablement à élucider la structure des Bactéries, étude qui, malgré la petitesse plus considérable de ces organismes, nous parut relativement plus aisée, par suite de leur colorabilité moins difficile, et d'une pénétration plus parfaite des teintures basiques.

Nous ne saurions trop exprimer notre reconnaissance à M. le professeur Chatin qui a bien voulu nous admettre à travailler au Laboratoire d'histologie comparée de la Sorbonne, pour les conseils et les encouragements qu'il nous a prodigués au cours de nos recherches.

A M. le docteur P. Vigier qui a examiné avec la plus grande amabilité nos préparations, qui les a commentées et qui nous a toujours témoigné le plus vif intérêt.

Qu'il nous soit permis également d'adresser à M. le professeur Matruchot nos sentiments de respectueuse gratitude.

Nous ne voulons pas oublier nos Professeurs MM. Guignard et Guéguen, près desquels nous avons toujours trouvé le plus bienveillant accueil, et remercions le docteur Barillé de l'appui affectueux et cordial qu'il n'a cessé de nous prodiguer.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE D'ENDOMYCES ALBICANS

CHAPITRE I

HISTORIQUE DES LEVURES

Nous ne passerons en revue que les travaux publiés sur cette question depuis 1902. Dans sa thèse de doctorat ès-sciences, Guilliermond donne une excellente bibliographie de la question. Il y joint une discussion approfondie des principaux résultats obtenus par les observateurs qui ont décrit la cytologie de ces organismes. Nous ne pouvons qu'approuver d'une façon générale les remarques de Guilliermond, qui a su tirer au clair cette intéressante question de cytologie végétale.

Guilliermond (1902) [1-2] colorant à l'hématoxyline, au fer et au bleu de méthylène ou à l'hémalun, après des fixations à l'alcool, au sublimé, au liquide de Bouin ou à l'acide picrique, met en évidence dans la cellule des Levures : 1° des corpuscules métachromatiques, sous forme de granulations incluses dans des vacuoles du cytoplasme, ou bien de tractus disposés au voisinage des noyaux, situés dans des vacuoles ou directement dans le cytoplasme; 2° un noyau qui se trouve constitué par un nucléoplasme incolore, avec plusieurs granules chromatiques, dont l'un, plus gros et plus régulier, pourrait figurer le nucléole. Quand cet organite nucléaire est très pauvre en chromatine, on aperçoit alors seulement

le nucléole; 3° des vacuoles glycogéniques qui grossissent peu à peu, en rejetant le noyau et la vacuole à corpuscules métachromatiques (dont elles sont parfaitement indépendantes) à la périphérie. L'auteur étudie le développement de la levure et montre que le glycogène disparaît peu à peu, quand la fermentation se ralentit et qu'il est alors remplacé par la vacuole à corpuscules métachromatiques. L'auteur étudie le processus de bourgeonnement et démontre que la division nucléaire s'effectue par amitose. La vacuole à corpuscules métachromatiques émet en même temps un diverticulum qui entraîne quelques corpuscules métachromatiques. Le plus souvent, cet étirement de la vacuole dans le bourgeon, précède la division nucléaire. L'auteur décrit, avec détails, les phénomènes de sporulation et met en évidence avec précision le rôle des corpuscules métachromatiques dans ce processus.

Hirschbruch [8 bis] (1902) étudie les formes de dégénérescence de la levure et de *Saccharomyces ellipsoideus*, et met en évidence des formes de structure excessivement étranges et certainement consécutives à des vices de technique.

Janssens et Mertens [9-10] (1903), étudiant la structure d'une *Torula rose*, aperçoivent dans la cellule un noyau se divisant inégalement dans certaines circonstances.

Guilliermond [3] (1904) corrobore ses précédentes recherches et démontre qu'il existe, chez les levures, deux types de structure nucléaire. 1° Un nucléoplasme, limité par une membrane avec nucléole et filets de granules chromatiniens; 2° un nucléoplasme limité par une membrane et un unique granule chromatique ou chromoblaste, que l'auteur assimile à un nucléole. L'auteur n'a jamais pu assister, même au moment de la sporulation, à des figures caryocinétiques.

Swellengrebel [14] (1905) fixant au Lavdowsky, colorant à la laque ferrique, parvient à différencier dans la levure pressée un véritable noyau vésiculeux. Il observe un certain nombre de stades de divisions nucléaires, rappelant la mitose et voit se constituer une formation de chromosomes avec plaque équatoriale, fuseaux chromatiques et peut-être deux centrosomes. Dans le noyau, le nombre des chromosomes pourrait être de quatre.

Fuhrmann [8] (1905) fixe au liquide de Hermann, colore à l'hématoxyline au fer des coupes en série de *Saccharomyces ellipsoideus*,

et voit que le noyau à l'état de repos, est constitué par un petit amas de granules chromatiques baignés dans un nucléoplasme entouré d'une membrane. Au début de la mitose, Fuhrmann observe un accroissement de la substance chromatique, accompagné d'une résorption de la membrane nucléaire. Quatre chromosomes apparaissent, qui se disposent en plaque équatoriale au milieu d'un fuseau achromatique. Au stade de métaphase, on aperçoit huit chromosomes; viennent ensuite les stades, diastroïde, dispirème. La division nucléaire précède toujours la formation du bourgeon, qui n'apparaît que lorsque le noyau est déjà au stade diastroïde. On voit donc que ces résultats confirment en tous points ceux de Swellengrebel.

Van Hest (1906-1907), dans un très long Mémoire, essaie de démontrer que ce que l'on regarde dans les levures comme une vacuole est en réalité le résultat d'une illusion d'optique. Nous ne suivrons pas l'auteur dans ses raisonnements, aussi complexes qu'erronnés.

Kohl [11-12] (1907-1908), dans un important travail sur les levures, confirme les recherches de Guilliermond, et observe que ces cellules renferment du glycogène pendant les périodes actives de fermentation. Indépendamment des vacuoles glycogéniques, Kohl met en évidence des vacuoles renfermant des granules réfringents (corpuscules métachromatiques). Sur le pourtour des vacuoles, l'auteur observe des petits granules qu'il assimile à des cristalloïdes de protéine. La division nucléaire s'effectue par amitose, aussi bien dans le bourgeonnement que dans la sporulation. Dans ce dernier cas, l'épiplasme renferme, à côté de très nombreuses granulations basophiles, un noyau extrasporaire non utilisé et correspondant au noyau extrasporaire de Moeller.

Ottolenghi [13] (1909) met en évidence dans les levures le réticulum de Golgi. Il observe, dans les cellules ainsi traitées, des granules irréguliers disposés dans tout le protoplasme, des éléments ressemblant à des noyaux, réunis les uns aux autres par des lignes droites ou courbes. Enfin un réseau de granules fins et nombreux formant des corpuscules plus ou moins volumineux.

Guilliermond [4-5] (1909-1910) retrouve chez les Endomycétées des formations cytologiques analogues à celles décrites par lui dans les levures.

Guilliermond (1910) ne retrouve pas les figures caryocinétiques

du noyau des Levures décrites par Swellengrebel et Fuhrmann. Le noyau se diviserait par amitose. Guilliermond ne retrouve pas davantage le noyau extrasporaire de Moeller au début de la sporogénèse. Confirmant les travaux de Kohl, l'auteur met en évidence des granulations brillantes incolores, cytoplasmiques et indépendantes des corpuscules métachromatiques. Ces granulations sidérophiles abondent pendant les périodes actives de fermentation et doivent être considérées comme des produits de nutrition.

Wager et Peniston [15] (1910), fixant au formol à 6 %, au Gram ou au Pénryi, colorant à l'hématoxyline au fer, à l'hématoxyline de Delafield, à l'hématéine, les cellules de levure, ou se servant encore des mélanges tinctoriaux fuschine-acide, vert de méthyle, fuschine acide-bleu de méthylène, safranine-violet de gentiane, corroborent leurs premières observations (Wager, 1898).

Ils démontrent que le noyau comporte un nucléole accolé extérieurement à la vacuole nucléaire. Cette vacuole qui renferme des granulations animées de mouvements browniennes est entourée d'un réticulum périphérique et d'une sorte de capsule polaire en sorte qu'une large surface du noyau est en rapport avec le cytoplasme.

La vacuole nucléaire varie avec l'activité de la cellule. Le réticulum basophile, périphérique, vacuolaire ne semble disparaître qu'au moment de la sporulation.

La chromatécité de ce réticulum et du nucléole sont en rapport avec les différentes périodes de la fermentation.

Les auteurs mettent en évidence dans le cytoplasme de la graisse, des vacuoles glycogéniques et des corpuscules métachromatiques; ces derniers pouvant apparaître également dans la vacuole nucléaire où ils se trouvent appendus par de fins tractus. Parfois, la proportion de chromatine est si faible que le nucléole apparaît décoloré. Cet organe, ce caryosome possède alors au centre ou latéralement un granule qui pourrait faire penser au noyau de Guilliermond. Nucléole et réseau basophile donnent une réaction très nette du phosphore et du fer.

Guilliermond [6-7] (1910) reprend ses observations sur la cytologie des levures et répond à Wager et Peniston. Il corrobore ses précédentes recherches relatives à la structure du noyau et des corpuscules métachromatiques, et signale, en outre, dans le cytoplasme, principalement autour du noyau, l'apparition de grains basophiles,

sidérophiles, visibles sur le vivant, mais ne prenant pas, comme les corpuscules métachromatiques, le Neutralroth. Cette observation ne diffère que par le détail de nos recherches sur la cytologie du Muguet. Elles infirment, à n'en pas douter, les travaux de Wager et Peniston entachés d'une grossière erreur d'interprétation, sans doute consécutive à un vice de technique.

CHAPITRE II

TECHNIQUES GÉNÉRALES

COLLAGE

On sait l'importance qu'attachent les histologistes à éviter la dessiccation des préparations, au cours des manipulations multiples qui ont lieu depuis le collage des coupes jusqu'à leur montage définitif dans le baume. Les rétractions consécutives se produisent également avec les bactéries et les cellules de levures bien que ces organismes soient revêtus d'une membrane cellulosique, qui semblerait devoir résister aux déformations. En fait, l'opération du collage, mal conduite, peut amener d'importantes modifications dans la morphologie interne de ces organismes. Nombreuses, sont les techniques qui ont été utilisées en vue de faire adhérer sur lame ces micro-organismes; quelques-unes sont franchement mauvaises, d'autres sont longues et difficiles ou exigent une habileté manuelle que seul un travail prolongé confère.

Nous avons résolu très simplement la difficulté en utilisant la solution glycéro-albumineuse suivante :

Albumine d'œuf	25 cmc.	}	solution A.
Glycérine	20c mc.		
Eau	q. s. pour 60 cmc.		

On bat le blanc d'œuf avec soin dans la quantité d'eau prescrite, on ajoute la glycérine, on agite, on filtre, on prend :

Solution mère A.	4 cmc.	}	solution glycéro-albumineuse B.
Glycérine	1 cmc.		
Eau, q. s. pour	60 cmc.		

1) A l'aide d'une fine spatule de platine, on prélève la purée microbienne, que l'on délaie dans quelques gouttes de la solution glycéro-albumineuse B, contenue dans une capsule du même métal

(utilisé pour la facilité de la stérilisation de la culture); puis, avec la même spatule, en se servant de l'émulsion homogène obtenue, on effectue de larges étalements sur des lames convenablement décapées, et on laisse évaporer à l'air libre pendant 3 à 4 minutes. La préparation ne sèche pas, grâce à la présence de la glycérine. Le dépôt d'une légère buée fournie par l'air expiré permet d'obtenir sur les lames de verre un étalement encore plus régulier. Celles-ci sont alors plongées dans l'un des fixateurs appropriés que nous indiquerons par la suite. Ce dernier s'empare de la glycérine, tandis que l'albumine se coagule sous forme d'un réseau à fine maille, qui emprisonne, comme dans un filet, les cellules à étudier.

La couche d'albumine glycinée qui subsiste sur la lame, après évaporation de l'eau, est d'une épaisseur sensiblement égale à $2\ \mu$, épaisseur bien suffisante cependant pour empêcher la dessiccation des cellules, le liquide albumineux à faible tension superficielle grimpant le long des parois de la coque cellulaire ou y adhérant par simple viscosité.

II) On peut également modifier la technique de la façon suivante : le prélèvement microbien est délayé à l'aide d'une goutte de serum physiologique dans le tube d'une centrifugeuse. On fait affluer brusquement sur l'émulsion microbienne le fixateur voulu. On agite. Après un contact de 12 à 24 heures, selon les cas, on lave par centrifugation avec les liquides appropriés, on rince finalement à l'eau, à deux reprises différentes. Le culot est enfin délayé dans la solution glycéro-albumineuse, puis étalé sur lame. Après évaporation, la préparation est plongée dans l'alcool à 95° , où elle séjourne une heure afin de permettre la coagulation de l'albumine et d'assurer le durcissement du reticulum albumineux.

Dans les deux cas, le réseau est si délicat qu'il n'est jamais perceptible sur les préparations convenablement colorées; seuls, les micro-organismes apparaissent très nettement et admirablement fixés.

Le deuxième mode opératoire présente, sur le premier, l'avantage de pouvoir conserver indéfiniment, dans de l'alcool à 50° , des cellules de levure préalablement fixées, méthode avantageuse qui amène une économie de temps considérable. Elle peut avoir l'inconvénient, par suite des multiples centrifugations opérées, de provoquer la rupture des jeunes bourgeons, et ainsi de modifier la morphologie

externe de la cellule en voie de division ; aussi avons-nous donné le plus souvent la préférence à la première technique.

FIXATION

Le collage des organismes ayant été effectués, nous allons maintenant procéder à leur fixation. Cette opération importante et qui a donné lieu à une infinité de formules et de réactifs différents, doit être effectuée avec grand soin, car d'elle dépendent la précision et la netteté des résultats ultérieurs. D'un autre côté, nous avons imaginé un certain nombre de fixateurs moins brutaux, ou plutôt à concentration moins élevée, que ceux habituellement utilisés. Nous pensions en effet que l'action de certains stabilisateurs pouvait provoquer l'éclatement de noyaux délicats, et amener, par suite, d'importantes perturbations dans la morphologie interne de la cellule. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons préparé une série de fixateurs légèrement hypertoniques à la solution de chlorure de sodium à 10 ‰. Tous ceux énumérés ci-après ne nous ont pas servi dans le cours de notre travail. Nous les faisons figurer néanmoins, pensant qu'ils pourront être utiles à d'autres observateurs.

A) *Fixateurs légèrement hypertoniques*

α) *Formol.* — Le formol existe dans le commerce en solution aqueuse, à 35-40 %. Afin de partir d'un produit bien défini, nous l'avons préalablement analysé et dosé, en nous conformant aux prescriptions de la pharmacopée française de 1908. Le dosage a donné formol 37 gr. 76 %. Dans une première opération cryoscopique, on a déterminé l'abaissement du point de congélation Δ d'une solution de formol à 10.70 ‰ équimoléculaire du sérum physiologique de chlorure de sodium à 8 ‰, on trouve $\Delta = 0.32$ au lieu de -0.48 ; ce chiffre est évidemment trop faible, mais le résultat s'explique, par ce fait que nous avons négligé la dissociation électrolytique du chlorure de sodium, erreur importante, puisque les ions Na et Cl interviennent, comme des molécules, dans la détermination de Δ ; d'où la nécessité de tenir compte, dans la loi de Raoult, du facteur i indiquant cette dissociation.

En nous basant sur la proportionnalité des Δ aux concentrations, et sachant, d'autre part, qu'une solution de chlorure de

sodium à 10 ‰ possède un Δ égal à -0.585 , on devrait avoir

$$\frac{y}{-0.585} = \frac{10.70}{0.32}, \text{ d'où } y = 19.93.$$

Mais, quand on détermine expérimentalement l'abaissement du point de congélation d'une solution de formol à 19.93 ‰ (du formol commercial titré précédemment), on trouve, pour Δ , une valeur égale à -0.50 . Ce résultat aberrant s'explique encore : c'est qu'en effet la solution officinale de formol ne renferme pas en dissolution l'aldéhyde formique HCHO , mais une série de corps condensés plus ou moins hydratés CH_2O , $3\text{H}_2\text{O}$ et $(\text{CH}_2\text{O})_n$; en sorte que le produit dilué subit une véritable dépolymérisation, en tous points comparable à la dissociation électrolytique du chlorure de sodium. Ainsi donc, la théorie ne permet pas de déterminer avec précision le titre en formol d'une liqueur dont le point de congélation oscille aux environs de -0.58 . Dans le but d'éviter la plasmolyse des cellules, nous nous sommes arrêté à la solution de formol titrant 37 gr. 76 ‰ de formol commercial, ce qui donne pour Δ , une valeur égale à -0.65 . A titre documentaire, $\Delta = -1^\circ$ pour une solution renfermant 54 ‰ de formol commercial titré.

β) *Formol acétique*. — Par tâtonnement encore, nous avons déterminé la composition d'une solution de formol acétique pour laquelle $\Delta = -0.65$.

Formol.....	15 cmc.
Acide acétique	10 cmc.
Eau, q. s. pour	1.000 cmc.

γ) *Picro-formol acétique*. — Le cas se complique quand différents ions se trouvent en présence, et, dans ces cas complexes, les tâtonnements expérimentaux ont dû être nécessairement plus nombreux. La solution suivante présente un abaissement du point de congélation égal à -0.75 :

Formol à 37,76 ‰	15 cmc.
Acide picrique.....	6 gr.
Acide acétique.....	8 cmc.
Eau dist. q. s. p ^r	1.000 cmc.

Le maximum de complexité a lieu avec les deux fixateurs suivants :

δ) Acide acétique.....	3 cmc. 2	} $\Delta = - 0^{\circ}75$
Sublimé :.....	12 gr.	
Bichromate de potasse..	12 gr.	
Eau, q. s. pour.....	500 cmc.	
ε) Acide chromique.....	2 gr. 35	} $\Delta = - 0^{\circ}60$
Oxycyanure de mercure..	9 gr. 50	
Acide osmique.....	1 gr.	
Acide acétique.....	1 cmc. 5	
Eau.....	300 cmc.	

Ces divers fixateurs, légèrement hypertoniques, nous ont donné de bons résultats, notamment pour les Bactéries, et pour *Endomyces albicans*, plus particulièrement dans l'étude du réticulum basophile, mais en ce qui concerne ce dernier organisme dont la fixation nous apparaît plus difficile, il ne nous a pas semblé avantageux de faire usage de fixateurs sensiblement isotoniques et nous nous sommes bien trouvé de l'emploi des fixateurs usuels suivants : liquide de Bouin et surtout liquides de Lavdowsky et de Perenyi.

B) *Fixateurs usuels très fortement hyperloniques.* $\Delta > 6^{\circ}$.

a) Le Perenyi a l'avantage d'apporter une simplification dans l'édification structurale de la cellule, puisqu'il masque la coloration des corpuscules métachromatiques. Quant au Lavdowsky, préconisé par Swellengrebel dans l'étude de la mitose, il constitue le fixateur le plus net et le plus précis de corpuscules métachromatiques. Les résultats qu'il fournit sont supérieurs à ceux que donne l'alcool absolu, qui a, de plus, le gros inconvénient de provoquer la rétraction de certaines formations cytoplasmiques; il se montre également préférable au Bouin, au formol-acétique et à notre stabilisateur picro-formique dont la teneur élevée en acide picrique altère les corpuscules métachromatiques.

Le Lavdowsky et le Perenyi permettent, à l'aide de colorants appropriés, de mettre en évidence les formations suivantes :

	CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES	NOYAU	RÉTICULUM BASOPHILE
Lavdowsky.	+	+	+
Perenyi.	0	+	+

Le Perenyi fournit cependant une définition plus parfaite du noyau ou des systèmes nucléaires, que le Lavdowsky.

b) Pour tous les stabilisateurs, la durée de la fixation doit être de 24 heures, mais elle peut être poussée sans inconvénients à 48 heures pour le Lavdowsky ; car les fixations de faible durée (2 à 3 h.) ne nous ont jamais permis de mettre en évidence avec précision tous les détails de structure que nous décrirons par la suite.

c) Au sortir des liquides de fixation, les lames sont copieusement lavées avec de l'alcool à 35° (1), puis immergées 10 à 15 minutes dans une cuve renfermant de l'alcool au même titre. Une opération semblable est répétée avec de l'alcool à 70°. Finalement, les préparations sont immergées dans de l'alcool à 95° où elles séjournent 2 heures. Cette opération a pour but d'assurer le lavage parfait des préparations, et de parachever la coagulation du réticulum albumineux, particulièrement fragile après les fixations au Perenyi. Cette action de l'alcool est en outre complémentaire de celle des stabilisateurs employés. Elle permet de réaliser des préparations plus nettes, en concrétant avec précision les formations cytoplasmiques et le noyau.

d) Nous allons maintenant passer à la régression alcoolique des préparations. La partie supérieure de la lame, enduite de micro-organismes est largement arrosée d'alcool à 95°, puis placée bien horizontalement sur le support d'une chambre humide. Une lente évaporation de l'alcool permet ainsi de passer par tous les stades de la régression alcoolique et avec le minimum de déformation pour la cellule. Il ne reste plus à la surface du couvre-objet qu'une très légère couche aqueuse. Une immersion de quelques minutes dans l'eau distillée, assure la parfaite hydratation des microorganismes fixés.

COLORATIONS

A) *Colorations vitales*

Nous nous sommes servi presque exclusivement du rouge neutre et du bleu de méthylène, tous deux en solution aqueuse à

(1) Un lavage préalable à l'eau distillée est nécessaire après emploi de nos fixateurs c et s.

1 ‰. Au moment du besoin, la solution colorante est diluée dans 2 à 4 volumes de solution chlorurée physiologique, afin d'éviter l'action toxique de l'eau distillée sur les microorganismes étudiés. Alors que le rouge neutre constitue le colorant de choix dans l'étude des Levures, il se montre franchement inférieur au bleu de méthylène dans l'observation des bactéries vivantes. La réciproque existe d'ailleurs, puisque le bleu ne pénètre qu'imparfaitement les cellules des Saccharomycétées.

La technique est la suivante : sur une lame de verre parfaitement décapée, on dépose une goutte de la solution colorante convenablement étendue, puis, à l'aide du fil de platine chargé du produit bactérien, on effectue une émulsion parfaite. On dépose un couvre-objet sur la goutte de colorant, on examine avec l'objectif à immersion.

B) Coloration après fixation

Dans l'étude de chacun des stades évolutifs des organismes que nous avons observés, nous avons employé simultanément des fixateurs et des colorants variés, afin de mettre en évidence par la comparaison des préparations les diverses formations cytoplasmiques qui échapperaient, à coup sûr, si on ne faisait usage que d'un fixateur et d'un colorant uniques. Les indications fournies par chaque colorant varient d'ailleurs suivant la nature du fixateur utilisé. Après essai d'un grand nombre de colorants : thionine, Giemsa, Ehrlich-Biondi-Heidenhain, magenta phéniqué, etc... nous nous sommes arrêté aux teintures qui suivent :

a) *Hématoxyline ferrique* suivant la technique de Heidenhain. Mordantage pendant 4 heures dans une solution d'alun de fer à 5 %. Lavage à l'eau distillée.

Immersion de 12 à 18 heures dans une solution d'hématoxyline à 0 gr. 70 %. Lavage à l'eau, régression sous le microscope dans la solution alunée à 2 %. Lavage à l'eau distillée.

Coloration du fond à l'éosine ou à l'érythrosine.

Cette méthode fournit d'admirables colorations nucléaires chez les Bactériacées. Chez *Endomyces*, elle définit avec précision le reticulum basophile diffus, après fixation par le Perenyi.

b) *Hématéine alunée*. — L'hématéine fournit des colorations nucléaires plus électives quoique moins précises, peut-être, que celles

réalisées par l'hématoxyline au fer. On pratique une surcoloration de une à deux heures suivie d'une régression, selon la technique que nous indiquerons dans le paragraphe suivant :

c) *Hématéine alunée acide* :

Hématéine alunée	5 cmc.	} Extemporannée.
Acide acétique...	1 goutte.	

Cette liqueur permet une définition plus précise des contours nucléaires que l'hématéine alunée. La surcoloration varie de 30 minutes à 1 heure 1/2; elle est suivie d'une immersion dans l'eau courante, de 10 minutes. Dans les deux cas, la régression a lieu à l'aide de la solution aqueuse d'acide picrique à saturation. On lave encore à l'eau courante afin de rendre au noyau la coloration bleutée spécifique, puis on colore le fond à l'éosine. Dans certains cas, il est préférable de remplacer la solution picriquée par le liquide de Van Gieson, qui fournit simultanément régression et coloration cytoplasmiques. La différenciation est très rapide et doit être surveillée attentivement. On lave de suite aux alcools sans passer par l'eau. Le noyau se profile sur le fond jaune rougeâtre du cytoplasme, plus nettement qu'après les colorations du fond à l'éosine ou l'érythro-sine.

d) *Violet de gentiane phéniquée*. — Cette teinture nous a fourni des colorations admirables de netteté et de précision, la durée du contact est généralement de 45 minutes à une heure, mais peut durer plus longtemps, 12 heures et 24 heures. La régression consécutive se pratique avec l'alcool chlorhydrique à 0 gr. 20 %.

e) *Bleu polychrome*. — Employé spécialement à la recherche des corpuscules métachromatiques, le bleu polychrome donne pour l'étude de ces granulations les meilleurs résultats. Durée de coloration : 1/2 heure à 1 heure.

Régression à la Glycerinæthermischung pure.

Lavages rapides à l'eau, à l'alcool à 30°, alcool absolu, xylol et baume.

f) *Safranine anilinée*. — Ce colorant fournit sensiblement les mêmes résultats que le violet de gentiane phéniqué.

Durée de coloration : 24 à 48 heures.

Régression : alcool chlorhydrique à 0.20 %.

TABLEAU DES INDICATIONS CHROMATIQUES

COLORANT EMPLOYÉ	TEMPS de SURCOLORATION	RÉGRESSION	COLORATION du FOND	NOYAU		CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES		RETICULUM BASOPHILE	
				Perenyi	Lavdowsky	Perenyi	Lavdowsky	Perenyi	Lavdowsky
Hématoxyline ferrique.	Mordançage de 4 heures dans alun de fer Co- loration 12 h. dans hématoxy- line.	Alun de fer.	Eosine ou Erythrosine.	Coloré.	Coloré.	0	Rarement colorés.	Coloré.	Coloration moins nette.
Hématéine alunée.	1 h. à 2 heures	Acide picrique saturé ou Van Gieson.	Eosine ou Van Gieson.	Coloré.	Coloration moins nette.	0	Colorés.	0	0
Hématéine alunée acide.	1/2 h. à 1 h. 1/2.	Acide picrique saturé ou Van Gieson.	Eosine ou Van Gieson.	Coloré.	Coloration moins nette.	0	Colorés.	0	0
Violet de gentiane phéniqué.	1 h. à 24 heures.	Alcool chlorhy- drique à 2 %.	0	Coloré.	Coloration moins nette.	0	Colorés.	Coloré.	Rarement coloré.
Safranine anilinee.	2 1/4 à 48 heures.	Alcool chlorhy- drique à 2 %.	0	Coloré.	Coloration moins nette.	0	0	Coloré.	Rarement coloré.
Bleu polychrome.	1/2 h. à 1 heure.	Glycerinaether- mischung.	0	Coloré.	Mal coloré.	0	Colorés.	Coloré.	Coloration peu nette.

Tous les colorants dont nous avons fait usage proviennent de la Maison Grüber, de Leipzig.

Toutes nos préparations ont été montées au baume du Canada, après lavage rapide à l'alcool absolu et immersion dans le xylol.

Nous avons toujours pris grand soin d'éviter la dessiccation des préparations, dessiccation qui amène d'importantes perturbations dans la morphologie interne de la cellule.

Le tableau ci-contre (p. 19) résume les indications des colorants et leurs propriétés chromophiles respectives.

MILIEUX DE CULTURE

A) *Endomyces*

I) Le muguet a été tantôt cultivé sur carotte, substratum de choix pour l'étude de cet organisme, tantôt sur pomme de terre. Alors que sur le premier milieu apparaissent uniquement les formes levures, sur le deuxième prennent naissance, simultanément, des formes levures et des formes filamenteuses, les premières prédominant toutefois. Nous ne pouvons parler de ces milieux sans faire allusion à leur stérilisation, ce qui donne lieu à un certain nombre de considérations importantes. Toutes choses étant égales, en partant de deux carottes différentes, on peut noter des retards considérables dans l'apparition des colonies d'*Endomyces*, certaines racines, à parenchyme plus tendre, fournissant en effet des cultures plus luxuriantes; d'autre part, sur une même carotte la vitesse d'apparition des colonies et la prolifération microbienne dépendront de l'ensemencement, suivant qu'il aura lieu dans la zone corticolibérienne ou en plein parenchyme ligneux. La cuisson des substrata intervient également et diffère encore pour peu que les tubes de culture soient tassés dans les paniers des stérilisateurs; il adviendra ainsi, que les milieux de culture périphériques seront plus cuits que ceux du centre, où la chaleur ne pénètre qu'imparfaitement. Ces considérations, qui peuvent paraître puéres à des bactériologistes, ont ici une importance considérable. Les inconvénients qui résultent de l'utilisation en cytologie bactérienne de milieux végétaux ne sauraient avoir lieu avec les substrata artificiels, préparés synthétiquement et de composition parfaitement déterminée.

II) Comme le muguet végète sur la muqueuse buccale et qu'il est, dans certains cas, susceptible de s'infiltrer en profondeur dans les masses musculaires, nous avons pensé lui fournir un milieu riche en substances albumineuses. A cet effet, nous avons préparé le milieu suivant :

Calodal	10 grammes.
Glycérine.....	10 —
Saccharose.....	10 —
Gélose.....	15 —
Eau.....	1.000 —

Mais les résultats obtenus ont été peu satisfaisants, ce qui nous a obligé à rejeter ce milieu dystrophique.

En vue d'obtenir d'abondantes formes filamenteuses, nous avons fait usage du milieu suivant, dont la composition minérale est celle indiquée par Linossier, comme étant la plus favorable à la culture de cet organisme. Ce substratum nous a d'ailleurs donné entière satisfaction.

Il répond à la composition suivante :

Eau distillée.....	1.000 cmc.
Sulfate de magnésie	0 gr. 05
Sulfate de fer	0 gr. 02
Sulfate de zinc.....	0 gr. 02
Sulfate d'ammoniaque	1 gr.
Carbonate de soude.....	0 gr. 10
Phosphate de potasse	0 gr. 50
Saccharose	3 gr.
Gélose	15 gr.

B) Bactéries

Dans l'étude des Bactéries, les milieux gélosés suivants se sont montrés particulièrement favorables à l'étude de ces microorganismes

Milieu a) Calodal (1).....	5 gr.
Peptone.....	15 gr.
Glycérine.....	10 gr.
Saccharose.....	10 gr.
Gélose	20 gr.
Eau	1.000 gr.

Milieu b) Peptone	20 gr.
Glycérine	10 gr.
Saccharose	10 gr.
Eau	1.000 gr.
Gélose	20 gr. (milieu de Guéguen).

Les milieux *a* et *b* neutralisés sont rendus légèrement alcalins par addition de soude caustique normale.

$$\left[4 \text{ cc}^3 \text{ NaOH } \frac{\text{N}}{\text{I}} \text{ pour } 1.000 \text{ cc}^3 \right]$$

(1) *Etude du calodal*. — Le calodal ou substance albumineuse de Heyden se présente sous la forme d'une poudre fine, soluble dans l'eau et utilisée en thérapeutique pour l'alimentation azotée par voie hypodermique. Ses caractères physicochimiques déterminés par nous sont les suivants :

a) La solution aqueuse ne précipite pas par la chaleur, mais précipite à chaud en présence de l'acide acétique.

b) La solution à 1/40^e ne précipite pas par le sulfate de soude à saturation, cependant, cette solution saturée, fournit un abondant coagulum sous l'action de la chaleur, et un précipité volumineux par addition d'acide nitrique.

c) La solution au 1/40^e, traitée par le sulfate de magnésie, fournit un abondant précipité que l'on sépare par filtration, le filtrat limpide se trouble encore par l'acide nitrique et abondamment par le sulfate d'ammoniaque à saturation.

d) Le filtrat qui résulte de la précipitation du calodal au 1/40^e, par le sulfate d'ammoniaque à saturation, ne présente plus les caractères physiques des solutions albumineuses. Il ne trouble même pas le réactif, pourtant si sensible, de Tanret.

e) Les caractères de précipitation de cette substance montrent qu'elle est constituée par un mélange d'albumoses et de globulines, mais elle ne renferme pas de peptones. La solution de calodal est neutre au tournesol, elle ne réduit pas la liqueur de Fehling et présente les caractéristiques suivantes :

Pouvoir rotatoire : α (D) =	79.99
Azote totale N =	11 gr. 40 %
Humidité à 100°.....	14.41 %

Cette substance, riche en albumine, d'une utilisation et d'un maniement commodes, pourrait probablement rendre des services dans l'isolement de certaines espèces bactériennes qui nécessitent, pour leur prolifération, des milieux riches en colloïdes albumineux.

CHAPITRE III

CYTOLOGIE D'ENDOMYCES ALBICANS

(FORMES LEVURES)

COLORATIONS VITALES

Dans l'espoir de colorer le noyau d'*Endomyces*, nous avons songé à utiliser la propriété que possèdent certains pigments végétaux, d'être énergiquement colorés, et pensions que ces couleurs pourraient se fixer sur le noyau ou les inclusions cytoplasmiques. A cet effet, nous nous sommes servi du pigment rouge extrait de la betterave, et du pigment jaune retiré du style et des stigmates du safran.

A) *Rouge de betterave*

La racine de betterave soigneusement pulpée puis broyée au sable lavé, est traitée par lixivation avec une quantité suffisante d'eau distillée. La colature aqueuse obtenue, filtrée, est évaporée dans le vide sulfurique à consistance sirupeuse. Le résidu épais est alors repris par 3 volumes d'eau, tandis que la liqueur obtenue est soumise à une énergique centrifugation, afin de la débarrasser de ses particules en suspension. La solution colorante, d'un beau rouge carmin, est conservée par l'addition d'un petit cristal de camphre.

Cette solution ne nous a jamais donné de résultats satisfaisants; la cellule se montre, en effet, réfractaire à la pénétration par le rouge de betterave, ce qui doit tenir, sans doute, à ce fait que ce colorant est de nature colloïdale.

Colorant du safran. — La macération, dans l'eau, de la poudre de safran n'a pas donné de résultats plus satisfaisants. Ni la vacuole, ni le cytoplasme ne se colorent; seuls quelques grains cytoplasmiques sont visibles, légèrement teintés en bleu. Devant la négativité des résultats obtenus par les pigments végétaux, nous nous sommes adressé pour pratiquer les colorations vitales de cet orga-

nisme au rouge neutre et au bleu de méthylène, tous deux employés en solution isotonique à 2 p. 10.000.

B) *Bleu de méthylène*

Le pouvoir de pénétration de ce colorant vis-à-vis des cellules d'*Endomyces* est faible. Il est possible, néanmoins, d'apercevoir un petit corpuscule réfringent et bleuté, tantôt accolé à la vacuole, tantôt superposé à cette vacuole, où il est alors vu par projection. Ce corpuscule peut être homologué au noyau de la cellule, ainsi que l'observation ultérieure des préparations fixées et colorées le démontrent. Certaines cellules, cependant, prennent avec intensité la coloration bleue, mais alors l'examen ne permet plus de reconnaître de structure nettement définie. Le cytoplasme est granuleux, la vacuole teintée en bleu. On est, dans ce cas, en présence d'organismes à vitalité presque éteinte, et qui n'ont pas pu résister à l'intoxication par le bleu de méthylène. Peut-être même ces éléments sont-ils morts et en voie de cytolyse ?

Rouge neutre. — Il en va tout autrement avec le rouge neutre. Les cellules présentent une vacuole parfaitement nette et légèrement colorée en rose par le Neutralroth. A l'intérieur de cette vacuole, et intimement adossé à la limite vacuolaire, on trouve un corpuscule, généralement en forme de calotte d'ellipsoïde, et prenant avec avidité la solution colorante. Tantôt unique, circulaire et volumineux, il est parfois remplacé par un système de corpuscules plus petits prenant avec la même avidité ce colorant. Ces corpuscules sont généralement fixes, mais il n'est pas rare de rencontrer dans certains éléments des petits grains sphéroïdes, inclus dans les vacuoles et animés de trémulations browniennes. Tous les termes de passage existent d'ailleurs entre ces granules sphéroïdes libres flottant dans le liquide vacuolaire et les disques en calotte, fixes et adhérents à la périphérie de la vacuole. Il n'est pas rare non plus de rencontrer des cellules multivacuolaires et qui possèdent également ces grains érythrophiles. Enfin, dans tous les éléments, on rencontre un petit corpuscule réfringent, extérieurement accolé à la vacuole, mais ne prenant pas les colorants. Les préparations fixées et colorées démontrent que ce grain doit être assimilé à un noyau.

Tel est l'état de la cellule au troisième jour de son développement.

La carotte ne peut pas cependant donner comme milieu de

culture des résultats toujours rigoureusement comparables. Tantôt, en effet, l'accroissement du champignon s'effectue, avec une grande rapidité, et la culture se trouve déjà perceptible à la septième heure; tantôt, au contraire, la prolifération ne s'effectue qu'avec lenteur; mais, dans les deux cas, la culture, après avoir crû suivant les deux directions de l'espace, longueur et largeur, sensiblement définies par la strie d'ensemencement, continue à augmenter légèrement suivant la troisième direction, en hauteur, formant ainsi un bourrelet caractéristique. Au quatrième jour, le développement s'arrête; à cet état, toutes les cellules sont sensiblement au même stade de leur évolution. Il est préférable, cependant, d'observer les corpuscules érythrophiles un peu plus tôt, vers le troisième jour.

Au premier et au deuxième jour, ni le noyau, ni la vacuole n'apparaissent. Est-ce à dire que ces formations soient absentes? Non, puisque les préparations fixées et colorées les mettent en évidence, mais elles échappent à l'observateur par suite de la densité cytoplasmique. Au sixième et au septième jour, les cellules ne présentent plus de corpuscules colorés. Ils ont subi une véritable dissolution, en sorte que la vacuole apparaît maintenant teintée en rose. A ce stade, le noyau est très apparent et se trouve toujours en rapport avec la vacuole centrale. Quant à la dissolution des corpuscules, elle paraît précédée d'un étalement de la calotte, qui se transforme en une véritable nappe rougeâtre, parabolique, comme si la surface de contact entre le liquide vacuolaire et la nappe devait s'accroître en vue de hâter la dissolution corpusculaire. Quand la prolifération est très intense, c'est-à-dire au deuxième et troisième jour, alors que le cytoplasme est encore dense et que les colorations au rouge neutre ne permettent d'apercevoir dans la cellule que les corpuscules érythrophiles, on voit, dans certains éléments en puissance de bourgeonnement, ces organites émettre un ou plusieurs petits grains également colorés.

Les jeunes bourgeons possèdent, en effet, une granulation ou un amas de granulations, sans doute issues de la cellule mère. Nous disons sans doute, car nous voyons bien évidemment les deux stades, initial et terminal du bourgeonnement du corpuscule coloré, mais nous avons trop rarement pu assister à la phase intermédiaire, dans laquelle le grain projeté dans le bourgeon est encore en relation avec le corpuscule maternel, pour pouvoir généraliser.

Autres colorants vitaux. — Le brun Bismark, le bleu de toluidine et le rouge Congo ne fournissent aucun résultat satisfaisant, pas plus, d'ailleurs, que le mélange bleu de méthylène et de rouge neutre.

PROTOPLASMA

L'étude du protoplasma est particulièrement aisée sur les cellules au troisième jour du développement. Cette formation, constituée par un spongioplasme à mailles plus ou moins larges, est mise en évidence, avec netteté, sur les préparations colorées à l'hématéine éosine, au bleu polychrome ou au violet de gentiane. Le réseau cytoplasmique, limité à la périphérie par la membrane cellulaire, est bordé intérieurement par la vacuole. Il affecte différents aspects :

a) Tantôt la cellule est parcourue d'une extrémité à l'autre par une travée cytoplasmique brisée, médiane, tandis que des angles de cette ligne, se détachent des tractus, qui vont rejoindre la couche de cytoplasme périphérique doublant la face interne de la membrane.

b) Tantôt la vacuole se trouve limitée par une zone de cytoplasme, que des trabécules protoplasmiques reliaient à la zone périphérique.

c) Fréquemment aussi, le réseau est constitué par un système d'alvéoles polyédriques, très petites.

d) Parfois enfin, du centre de la cellule s'irradient des travées de protoplasme, ce qui donne à cette formation une véritable structure rotacée. Cette sculpture cytoplasmique est-elle la représentation exacte de ce qui a lieu dans la cellule, ou faut-il y voir un artifice de préparation consécutif à l'action des fixateurs ? Il est bien difficile de se prononcer dans un sens ou dans l'autre, mais ce que nous pouvons dire, c'est que tous les fixateurs employés : Bouin, Perenyi, Flemming, alcool, fixateurs isotoniques, mettent en évidence cette structure spongieuse du cytoplasme. Les colorations vitales définissent parfois de semblables aspects, sur des cellules en voie de vitalité décroissante et se colorant en masse par le rouge neutre ; tandis que sur les cellules parfaitement vivantes, la vacuole seule se teinte faiblement en rose, ce qui démontre évidemment la nature différente du contenu vacuolaire et du cytoplasme.

A) *Graisse*

La recherche de la graisse effectuée à l'aide de l'acide osmique en solution à 1 %, sur des cellules au troisième jour du développement, est demeurée négative.

B) *Glycogène*

La recherche du glycogène ne nous a donné aucun résultat, aussi bien en employant les techniques classiques : fixation par l'alcool à 95° et coloration par une solution gommeuse d'iodure de potassium iodurée, qu'en utilisant la méthode plus élective préconisée par Fischer ou celle conseillée par Guéguen, cette dernière permettant en outre de colorer le cytoplasme et les graisses.

C) *Oxydase*

Ayant voulu pousser plus avant le chimisme de la cellule, nous nous sommes demandé s'il ne serait pas possible de déceler dans le cytoplasme des grains de zymogène. Etant donné les relations qui existent entre les oxydases et le fer et le manganèse, tous deux jouissant de propriétés oxycycliques parfaitement nettes, nous nous sommes appliqué à mettre en évidence ces deux métaux. Nos recherches à cet égard sont demeurées infructueuses. Il est vrai de dire que nous ne nous sommes pas inspiré des méthodes employées par Mac Callum, mais les résultats médiocres obtenus par cet auteur sur les levures, expliquent notre insuccès avec une méthode moins précise (fixation à l'alcool absolu, coloration au sulphydrate d'ammoniaque ou au sulfocyanure de potassium additionné de 1 % d'acide nitrique). Mais, de ce que ces métaux n'ont pu être décelés dans le cytoplasme, il ne s'ensuit pas nécessairement qu'ils ne puissent pas faire partie intégrante d'un groupement prosthétique déterminé dans lequel leurs propriétés chimiques ordinaires sont masquées. Cette recherche négative démontre simplement qu'avec les procédés actuels de la chimie analytique, nous sommes actuellement incapables de déceler des métaux, engagés dans des complexus albumineux, sans faire intervenir des réactifs brutaux et destructeurs.

Nous avons cependant pu obtenir une coloration particulièrement intéressante en utilisant la réaction si sensible des oxydases.

0,10 centigrammes de gaïacol sont dissous dans 0,50 cgr. d'alcool à 95°, on ajoute 8 centimètres cubes d'eau oxygénée officinale. Dans ces conditions, nous avons pu rencontrer des cellules dont certaines renfermaient une ou deux petites granulations très nettes se colorant en rouge vif (Culture sur carotte au troisième jour).

NOYAU

On comprendra combien cette étude est délicate quand on saura que cet organite a été confondu avec le corpuscule métachromatique et le réticulum basophile, et que le plus souvent il est passé tout à fait inaperçu. Nous avons déjà vu, en particulier, au sujet des corpuscules métachromatiques, qu'une projection de ces corpuscules, en dehors de la vacuole, sous l'action de certains fixateurs, avait amené une fâcheuse interprétation de ces granulations. La présence d'un réticulum basophile, diffus, à tous les stades du développement du microorganisme, complique encore le problème et permet d'expliquer les résultats de certains observateurs, qui voyaient dans les levures, tantôt un noyau morphologiquement défini, tantôt un système nucléaire plus ou moins diffus.

FIXATION ET COLORATION

Pour mettre en évidence, avec précision, le noyau d'*Endomyces* nous avons été obligé de recourir à différents fixateurs et colorants qui nous ont permis de délimiter la morphologie nucléaire et d'éliminer les formations accessoires qui masquent la présence de cet important organite. Nous avons déjà vu que le Perenyi possède une action dissolvante très nette sur les corpuscules métachromatiques. Ce fixateur nous permettra donc d'éliminer ces granulations. Le problème se complique lorsqu'il s'agit de masquer le réticulum basophile. Dans ce cas, en effet, les fixateurs ne le dissolvent pas, et l'on est obligé de recourir aux colorants pour éviter la confusion de cette formation avec le noyau. Dans ce but spécial nous avons rejeté l'hématoxyline au fer, le violet de gentiane, colorants nets, sans doute, mais trop diffus, pour nous en tenir finalement à l'hématéine, après fixation des organismes au liquide de Perenyi. L'hématéine constitue dans ce cas un colorant nucléaire pur. La morphologie de

la cellule apparaît alors, avec son minimum de complexité. La vacuole se dessine, nettement limitée par un cytoplasme à structure alvéolaire, tandis que le noyau, toujours parfaitement perceptible, est en rapport intime avec la vacuole. On a parfois avantage à recourir comme colorant plasmatique au Van Gieson, qui a la propriété de chasser la coloration violette du cytoplasme et de teinter celui-ci en jaune, fond sur lequel se détachent plus nettement les contours bleutés du noyau.

Nous ferons remarquer cependant que le bleu polychrome fournit, après les régressions suffisamment poussées, de très bonnes définitions nucléaires. Il est encore nécessaire de se servir dans ce cas du Perenyi. C'est qu'en effet ce stabilisateur se montre bien supérieur au Bouin, au Lavdowsky ou au formol acétique pour la fixation des noyaux. Après emploi des couples :

- I. Lavdowsky ... bleu polychrome ;
- II. Bouin bleu polychrome ;
- III. Formol acétique bleu polychrome,

on s'aperçoit que seuls les corpuscules métachromatiques se trouvent colorés. Les affinités chromatiques de la solution de Unna convergeant uniquement vers les grains de volutine, à l'exclusion presque complète du noyau, qui échappe à la coloration. Avec ces fixateurs, il est en outre possible d'observer le réticulum, ce qui complique encore la morphologie interne de la cellule ; après emploi du Perenyi, au contraire, ces inconvénients disparaissent. Le noyau est coloré avec netteté ; le réticulum, s'il apparaît parfois, est très faiblement teinté.

Le tableau suivant résume les indications chromphiles des corpuscules métachromatiques du noyau et du réticulum basophile d'*Endomyces albicans*.

POSITION

Le noyau est toujours en contact intime avec la vacuole à corpuscules métachromatiques. Disposé sur les côtés de celle-ci et à l'un des pôles de l'oïdie, ce n'est qu'exceptionnellement qu'il paraît occuper le centre de la vacuole, illusion qu'une mise au point convenable permet d'ailleurs de dissiper, cet organite étant toujours noyé dans le cytoplasme et compris entre la membrane de la cellule

TABLEAU DES AFFINITÉS CHROMATIQUES DES FORMATIONS CYTOPLASMIQUES,
D'ENDOMYCES ALBICANS

	CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES				NOYAU				RÉTICULUM BASOPHILE			
	Bouin	LAVDOWSKY	PERENYI	ALCOOL ABSOLU	Bouin	LAVDOWSKY	PERENYI	ALCOOL ABSOLU	Bouin	LAVDOWSKY	PERENYI	ALCOOL ABSOLU
Hématoxyline ferrique .	Noirs	Noirs	0	Noirs	Noir	Noir	Noir	Noir	Noir	Noir	Noir	Noir rétréci
Hématéine	Rouges	Rouges	0	Rouges	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu	0	0	0	0
Violet de gentiane . . .	Non employé			Pourpres	Non employé			Violet	Non employé			Violet mais rétréci
Bleu polychrome . . .	Rouges	Rouges	0	Rouges	Non perceptible	Non perceptible	Bleu	Non perceptible en général	Bleu	Bleu	0	Rouge mais rétréci

et la limitante vacuolaire. Dans les jeunes éléments issus du bourgeonnement, la vacuole peut faire défaut et n'apparaître qu'ensuite, ce qui tient à ce fait que la division nucléaire peut précéder l'étirement de la vacuole.

STRUCTURE

Suivant que les régressions sont plus ou moins poussées, le noyau apparaît tantôt comme un petit corpuscule aréolé, tantôt comme un organite sphéroïde dense et homogène. Le premier aspect morphologique nous intéresse seul, puisqu'il nous montre que le noyau d'*Endomyces* comporte, comme celui des Levures, une membrane nucléaire vésiculeuse limitant un caryoplasme, au sein duquel se trouve un caryosome unique.

DIVISION

La division nucléaire est en général précédée du bourgeonnement cytoplasmique, qui s'effectue avant même qu'on puisse apercevoir une modification dans la morphologie externe du noyau. Cette division paraît débiter inégalement, comme si la membrane nucléaire faisait hernie dans le cytoplasme ambiant (stade claviforme). Puis le caryosome se divise en deux, tandis que l'un des granules se dirige dans le diverticulum qui a pris naissance (stade clavculaire). Les noyaux désormais constitués se séparent l'un de l'autre par étirement, l'un d'eux se dirigeant vers l'évagination cytoplasmique qui a pris naissance (stade dédoublé). La division se fait donc, dans cet organisme, par une amitose spéciale, en ce sens qu'elle débute par un bourgeonnement inégal de la vésicule nucléaire. Nous n'avons jamais pu observer de figures caryocinétiques comme celles signalées et décrites par Swellengrebel dans la levure pressée. Pendant les périodes d'activité prolifère, il n'est pas rare de rencontrer des cellules munies de deux et trois bourgeons cytoplasmiques, ce qui donne lieu, dans ce dernier cas, à trois bipartitions nucléaires successives et très rapprochées.

Il ne paraît pas y avoir de règle précise en ce qui concerne la question de savoir lequel des noyaux, fils ou paternel, se dirige dans le bourgeon. La division nucléaire précédant parfois le bourgeonnement, il s'ensuit que bien souvent le noyau originel se dirige vers

l'évagination cytoplasmique, alors que le noyau qui a pris naissance dans l'amitose demeurera dans la cellule-mère. La réciproque existe d'ailleurs, sans qu'on puisse fixer le déterminisme qui provoque l'une ou l'autre de ces directions.

LES CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES

HISTORIQUE

L'étude des corpuscules métachromatiques est intéressante, car leur présence a été signalée chez un grand nombre d'organismes différents, sans que l'on ait pu, jusqu'à présent, élucider leur véritable nature chimique. Nous ne résoudrons pas le problème, mais nous apporterons quelques faits nouveaux à l'étude physico-chimique de ces granulations.

Décrits pour la première fois par Babès [1] (1887) dans *Bacillus tuberculosis*, ils furent considérés par cet auteur comme des spores.

Un peu plus tard, en 1889, Ernst [6], chez les Bactériacées et les Cyanophycées, les assimilent à des spores ou à des noyaux. Babès [2] (1895) en teignant les bacilles diphtériques par le bleu de méthylène, observe aux extrémités polaires des corps bactériens, de petites granulations érythrophiles, qu'il désigne sous le nom de corpuscules métachromatiques, tout en hésitant à les considérer comme des noyaux véritables.

Bunge [3] (1895) se pose en adversaire de l'hypothèse d'Ernst, et montre que ces granulations n'entrent pas dans la constitution des spores.

Bütschli [4] (1896) les décrit dans les Cyanophycées et nie leur nature chromatique; il les désigne sous le nom de grains rouges, en raison de leur métachromatie vis-à-vis des colorants bleus.

Lauterborn [24] (1896) les retrouve chez les Diatomées; Crato [5] les observe chez *Elodea canadensis*, et démontre dans ces granules la présence de la phloroglucine.

Matruchot et Molliard [27] (1902) décrivent dans une petite chlorophycée (*Stichococcus bacillaris*) à côté d'un noyau net et d'une formation basophile paranucléaire, ces mêmes grains, inclus dans des vacuoles, et qu'ils mettent en évidence à l'aide du violet de gentiane. Ils les considèrent comme dérivant d'une dégénérescence nucléaire.

Kunstler et Busquet [23] (1897) les signalent dans *Bacillus coli, subtilis*, les Mucoracées, les Urnes, parasites des Siponcles, et pensent que leur métachromasie n'est pas le résultat d'une affinité particulière de la substance pour les colorants, mais qu'elle serait due à la nature physique de ces granulations, se rattachant à une question de réseaux optiques.

Marx et Woithe [26] (1901) démontrent que leur apparition dans les cellules bactériennes est en rapport avec les conditions de vitalité parfaite de ces organismes, et estiment que la virulence des bactéries est fonction de ces corpuscules.

Kronpecher [22] (1901) les signale également dans les Bactéries endosporées, à côté de granulations cytoplasmiques de nature différentes.

En 1901, dans trois notes publiées à l'Académie des Sciences Guilliermond [10] démontre avec précision leur présence dans les levures, où ils sont localisés dans des vacuoles; il indique les fixateurs qui masquent ces corpuscules (liquide de Flemming, liquide de Perenyi), et ceux qui permettent leur coloration ultérieure (liquides de Bouin, de Lenhosseck, alcools) par les teintures basiques d'aniline bleues ou violettes (bleus de méthylène, de toluidine, de Unna, de crésyl, violet de gentiane, hématéine, hématoxyline). Les colorations vitales de ces corpuscules par le bleu de Nil, le bleu de méthylène et le rouge neutre, est un argument en faveur de leur nature extranucléaire. L'auteur les identifie aux grains sporogènes d'Ernst, aux grains rouges de Butschli ou aux corpuscules métachromatiques de Babès. Par des fixations et des colorations appropriées, cet auteur met en évidence un noyau parfaitement individualisé dont il étudie la structure. Il suit l'évolution de la vacuole à corpuscules métachromatiques au cours de la fermentation et considère les grains rouges comme des matériaux de réserve, qui seront ultérieurement englobés par les spores, au moment de la sporogénèse.

Guilliermond observe également la présence des corpuscules métachromatiques dans un grand nombre de moisissures.

En 1902 [11] dans une thèse fort remarquée, cet observateur complète ses recherches et propose de donner à ces corpuscules le nom de corpuscules métachromatiques, en souvenir de Babès, qui les avait, le premier, décrits et désignés.

Ernst [6] (1902), en étudiant par le bleu de méthylène et le rouge neutre un certain nombre de bacilles et de champignons, rejette ses affirmations premières relativement à la nature chromatinienne de ces granulations, ou à leur intervention dans la sporogénèse, et les rattache aux plasmosomes d'Altmann.

Grimme [9] (1902), dans une série de recherches sur *Spirillum volutans*, confirme les recherches et résultats de Guilliermond. Il donne à ces granulations le nom de grains de volutiné (volutans Kugel) et les considère comme des substances de réserve.

Dangeard décrit dans *Polyphagus euglenæ* des globules oléagineux qui ont des points communs avec les grains rouges de Butschli.

Babès et Protopopoff les mettent en évidence dans *Actinomyces*.

Guéguen les décrit dans *Penicillium glaucum*.

Maire [25] (1903) dans *Ustilago maydis*.

Villard [32] (1903) démontre que les Zoochlorelles de l'Hydre verte renferment des corpuscules métachromatiques et considère ces Zoochlorelles comme des organites migrants, symbiotes ou parasites à l'état de vie active.

Dans une série importante de recherches poursuivies de 1902 à 1904, Guilliermond retrouve les corpuscules métachromatiques chez un grand nombre de champignons et d'algues : Desmidiées, Diatomées, Euglènes et Bactéries, chez les Ascomycètes, et confirme leur rôle de substances de réserve.

Meyer [28-29], (1903-1904) reprend l'étude de ces granulations et propose de leur donner le nom de grains de volutine, en souvenir de Grimme, qui les avait découverts dans *Spirillum volutans*. Dans la première partie de son travail, Meyer corrobore les recherches de Guilliermond sur les caractères de coloration et l'évolution de ces corps. Il attire l'attention sur le rouge de Ruthénium qui fournirait une coloration élective de ces granulations.

Dans la deuxième partie de son travail, cet auteur établit huit réactions fondamentales de la volutine, dont voici l'énumération :

1° Les grains de volutine sont colorés par le bleu de méthylène et sont décolorés par l'acide sulfurique à 1 %.

2° La solution d'iode colore en brun les corpuscules métachromatiques traités au préalable par le bleu de méthylène. Les granules ainsi traités se décolorent lentement par la solution de carbonate de soude à 5 %.

3° Colorés à la fuschine phéniquée, ils se décolorent par l'acide sulfurique à 5 %.

4° La volutine se dissout dans l'eau bouillante.

5° La volutine se dissout dans l'eau de Javel.

6° La volutine se dissout dans une solution de chloral en cinq minutes, et ne se laisse plus ensuite colorer par le bleu de méthylène.

7° Durcis par le formol pendant trente minutes, ces granules ne peuvent plus être dissous par l'eau bouillante.

8° Colorés au bleu de méthylène les grains de volutine se décolorent ensuite par le carbonate de soude, 5 %.

L'auteur passe en revue l'action des différents agents chimiques : alcalis, enzymes, acide osmique, etc., sur ces grains. Il émet enfin l'hypothèse que ces corpuscules sont formés par la combinaison d'une base organique avec l'acide nucléique. Kohl se rallie à cette opinion.

Guilliermond [14-15] (1905-1906), poursuivant ses recherches, retrouve les corpuscules métachromatiques chez les Cyanophycées et montre, en particulier, que ces granulations sont en rapport intime avec le réseau chromatique, et qu'elles sont fonction de ce réseau qui les élabore. Cet auteur signale la présence de ces corpuscules dans plusieurs espèces bactériennes. *Bacillus radicosus*, mycoïdes, megatherium, alvei, asterosporus et montre qu'ils sont surtout localisés dans le cytoplasme, et non plus dans les vacuoles comme chez les Ascomycètes ; ces corps sont absorbés par les spores, au moment de la sporogenèse. Depuis, ces granulations ont été retrouvées par un grand nombre d'auteurs :

Fauré Frémiet [22] les observe dans *Cochliopodium pellucidum* et les met en évidence par le bleu de crésyl.

Schubotz les signale dans *Amæba proteus* et *Amæba villosa*.

Hamburger [21] (1905) dans *Dunaliella salina*.

Sassi dans les Euglènes et les Volvocinées.

Swellengrebel [31] (1908) les a rencontrés dans les Trypanosomes et démontre qu'ils sont localisés dans le cytoplasme au-dessus et au-dessous du noyau.

Reichenow [30] (1909), dans une étude sur *Hæmalococcus pluvialis* et divers Flagellés, met en évidence dans ces organismes, de très nombreux corpuscules métachromatiques. Il se demande si les chromidies de Hertwig ne rentreraient pas dans la catégorie des

grains de volutine. Cultivant *Hæmatococcus* sur des milieux aphosphorés, il constate que ces granulations disparaissent rapidement et, qu'à partir de ce moment, la cellule n'en élabore plus. Il leur assigne par suite une constitution nucléique et les considère comme des matériaux de réserve.

Fantham et Porter [8] (1909) les observent dans *Bacillus arenicolæ* et désignent leur substance sous le nom de métachromatine.

Elargissant le cercle de ses investigations, Guilliermond [27] (1906. — [16] (1906). — [18] (1907), se demande si ces granulations ne seraient pas susceptibles d'être rencontrées dans les cellules des métaphytes et des métazoaires. Seul, ou en collaboration avec Beauverie, cet auteur montre que les globoïdes de certaines graines présentent une métachromasie très marquée vis-à-vis des couleurs d'aniline bleues et violettes, qu'ils prennent le rouge de ruthenium et le vert de méthyle. Ils ne présentent cependant que cinq des huit réactions caractéristiques indiquées par Meyer. Ils ne se colorent pas par l'hématoxyline, ce qui empêche de les identifier d'une façon absolue avec les grains de volutine.

Avec Mawas, Guilliermond [19] (1908), démontre que les granulations basophiles des Mastzellen possèdent les mêmes caractères chromatiques que les grains rouges, à savoir : colorations vitales par le Neutralroth, le bleu de méthylène, métachromasie par les couleurs d'aniline violettes et bleues; fixation du rouge de ruthénium, de la safranine, du vert de méthyle; elles ne se colorent pas cependant par l'hématoxyline.

Enfin, tout récemment, dans une vue synthétique de la question, Guilliermond [20] (1910) propose d'attribuer à ces corpuscules l'appellation définitive de corpuscules métachromatiques, afin d'éviter le flottement et la confusion qui existent actuellement dans le langage scientifique. Cette désignation, due à Babès, qui le premier les a étudiés et observés, doit prévaloir sur toutes les autres : grains rouges de Butschli; grains d'anabénine de Fischer, grains de volutine de Meyer et Grimme.

Cette appellation possède, en outre, l'avantage d'indiquer avec précision une des propriétés les plus caractéristiques de ces corps : leur métachromasie. Nous ne pouvons que nous ranger à l'avis de Guilliermond, et approuvons entièrement le terme de corpuscules

métachromatiques, que nous emploierons, presque exclusivement, au cours de ce travail.

FIXATION ET COLORATION

a) On obtient d'excellentes fixations de ces corpuscules par les stabilisateurs à base de formol : Bouin, Lavdowsky, formol acétique. Certains fixateurs à base d'alcool et l'alcool lui-même donnent également de bons résultats.

Le Perenyi, l'acide picrique et les fixateurs osmiques, s'opposent aux colorations ultérieures de ces corpuscules. Les plus belles préparations sont obtenues par l'emploi du bleu polychrome de Unna. La coloration, qui dure de 3/4 d'heure à une heure, est suivie d'une différenciation ménagée par la Glycerinæthermischung. Les corpuscules métachromatiques apparaissent ainsi en rouge vif sur le fond incolore de la vacuole, qu'entoure le cytoplasme d'une teinte bleu pâle. L'hématéine fournit également de jolies préparations. Les corpuscules métachromatiques sont alors rouge violet, tandis que le cytoplasme est rose et le noyau bleuté (coloration du fond à l'éosine).

Le violet de gentiane, que nous avons également employé, colore ces granulations en rouge pourpre.

DESCRIPTION

Ainsi que les préparations fixées et colorées permettent de s'en rendre compte, les grains de vultine sont toujours compris dans les vacuoles. Généralement uniques, ils sont parfois cependant au nombre de deux ou trois et affectent les mêmes formes et la même localisation que ces grains érythrophiles que colorait vitalement le Neutralroth. Etant donné, d'autre part, que ces organites disparaissent de la cellule vers le sixième ou septième jour, et que les colorations vitales aussi bien que les préparations fixées et colorées mettent en évidence simultanément leur disparition, nous sommes amené à conclure à l'identité de ces corpuscules. L'étude de leurs propriétés physicochimiques corrobore d'ailleurs ces résultats.

Il est possible, dans certains cas, de noter une position extravacuolaire de ces granulations, ce que ne mettent pas en évidence les colorations vitales, et qui pourrait induire en erreur un observateur

non prévenu. En réalité, sous l'action brutale de certains fixateurs, les corpuscules métachromatiques, parfois en liberté dans le liquide vacuolaire, se trouvent projetés contre la paroi cytoplasmique; celle-ci, peu résistante, cède sous le choc, tandis que le granule va s'inscruster dans le cytoplasme et sembler devenir une inclusion de celui-ci, indépendante de la vacuole originelle. Cet artefact se présente avec une netteté particulière sur les préparations stabilisées par l'alcool absolu, puis colorées par l'hématéine. Il est d'ailleurs possible, de trouver tous les stades intermédiaires entre le grain libre dans la vacuole, ou paraissant l'être, lorsqu'il y est vu par projections, et le corpuscule intraprotoplasmique. Une observation délicate permet cependant de constater que le corpuscule métachromatique, ainsi projeté, se trouve engagé dans une invagination de cytoplasme et séparé de celui-ci par une fine zone auréolée. Cette observation démontre qu'il y a eu un simple refoulement et non pas une pénétration du grain de volutine. Il est important de signaler ce fait à un autre point de vue. Nombre d'auteurs ont, en effet, interprété ce corpuscule métachromatique unique, faussement extravacuolaire, comme un véritable noyau, et, dans d'autres cas, la vacuole et ses grains de volutine, comme un noyau vésiculeux avec des nucléoles. En fait, pour peu que l'on effectue une surcoloration à l'hématéine ou au violet de gentiane, la teinte métachromatique des grains rouges peut être masquée; le noyau, petit et de coloration délicate, passer inaperçu, en sorte que cette erreur permettrait de concevoir, dans les levures, tantôt un noyau unique, siégeant près d'une vacuole, tantôt un noyau vésiculeux, comprenant un caryoplasme, un caryosome et une membrane nucléaire.

GENÈSE

Les corpuscules métachromatiques se divisent par étirement. Au moment du bourgeonnement, il est possible de voir le vacuole s'évaginer et un corpuscule s'engager dans le bourgeon qui a pris naissance, en sorte que la cellule-fille possède, dès son origine, une petite vacuole avec son corpuscule métachromatique. Cette pénétration de la vacuole et du grain rouge dans le bourgeon paraît toujours précéder la division nucléaire. Quand le substratum est riche, le corpuscule grossit rapidement et se bipartit comme dans le cas des cellules adultes.

PHYSIOLOGIE

a) Un certain nombre d'observateurs ont voulu voir dans ces granulations des corpuscules de toxigène. C'est ainsi que Behring les considère comme les supports de toxines du *Bacillus tuberculosis*. D'autres, en se basant sur ce fait que les bacilles diphtériques vrais possèdent des corpuscules métachromatiques, mis en évidence par la méthode d'Ernst-Neisser, admettent que la virulence de ces bacilles est fonction de ces granulations. Guilliermond [32-33] s'oppose avec raison à cette manière de voir. L'expérience suivante, que nous avons effectuée, corrobore d'ailleurs les résultats de cet auteur. Injectons à un cobaye, par voie péritonéale, une culture de muguet au deuxième jour, constituée par des cellules abondamment pourvues de corpuscules métachromatiques; et, à un autre animal de même poids, une culture au sixième jour de son développement, dans laquelle les organismes sont à peu près dépourvus de corpuscules métachromatiques. Les deux cobayes meurent sensiblement à la même époque, vers le vingtième jour, de muguet généralisé. Cette expérience unique, et dont les résultats sont relatifs, montre cependant que ces granulations ne semblent pas devoir intervenir, dans le cas présent, comme vecteurs de toxines, ou accumulateurs de virulence.

b) Pour nous, tout autre est leur rôle. Etant donnée la généralité de leur présence, chez les organismes les plus divers, tant animaux que végétaux, nous pensons qu'ils sont fonction de l'activité cellulaire et constituent une substance de réserve, plus précoce que les matières grasses, qui sont fréquemment le signal d'une dégénérescence ou d'une diminution de la vitalité cellulaire. Ils disparaissent des éléments quand le milieu est épuisé.

L'expérience suivante, met parfaitement en évidence leur rôle de substance de réserve. D'une luxuriante culture sur carotte, en pleine élaboration métachromatique, nous effectuons avec une spatule de platine un large prélèvement que nous ensemençons dans un tube renfermant une solution de chlorure de sodium à 8 ‰; substance chimique indifférente vis-à-vis du muguet, puisque les ions Na et Cl n'entrent pas comme élément dans la constitution de la cellule. Cet haloïde, dépourvu de toxicité, joue cependant un rôle physique indispensable, puisqu'il permet d'éviter l'action plasmo-

lysante et nocive de l'eau distillée sur cet organisme. La culture est abandonnée à la température de 18°. Un premier prélèvement, effectué à la vingt-quatrième heure du jeûne, montre que 65 % des cellules sont dépourvues de grains rouges. Au bout de 48 heures, 80 % des éléments n'en possèdent plus, alors qu'il faut attendre en général le septième jour, en culture normale, pour atteindre le premier résultat. Cette expérience démonstrative met bien en évidence le rôle des corpuscules métachromatiques comme substance de réserve.

MICROCHIMIE

L'étude microchimique de ces granulations, à peine ébauchée, est entièrement à entreprendre. D'une façon générale, trois voies s'ouvrent devant les chercheurs.

A) *Microchimie proprement dite.*

La première qui paraît la plus fréquemment suivie, ne semble donner que des résultats médiocres et incertains, chez des organismes de petite taille, comme les Levures, à cytoplasme difficilement pénétrable, et réagissant péniblement aux colorants. Elle consiste à effectuer par voie microchimique l'étude de telle inclusion cytoplasmique que l'on désire étudier. Mais ces recherches sont actuellement fort délicates, par suite des tortures chimiques auxquelles on est obligé de soumettre la cellule. La méthode cependant peu traumatisante de Mac-Callum, dans la recherche du fer, n'a donné, chez les Levures, que des résultats erronnés. Que dire alors de la recherche du phosphore par le procédé de Lilienfeld et Monti, où la cellule est successivement soumise à l'action du molybdate d'ammoniaque et du pyrogallol ! Les méthodes actuelles de chimie analytique appliquées à la microchimie sont donc imparfaites. Est-ce à dire, cependant, que tous les résultats obtenus soient dépourvus de valeur ? Non, certes, les indications fournies par le Sudan III et l'acide osmique dans la coloration des graisses, sont bien définies. Celles que donnent l'iode pour la recherche de l'amidon et du glycogène, le perchlorure de fer pour la localisation du tannin en histologie végétale, sont définitivement acquises.

Le colorant de Guéguen, si employé par les mycologues et les

lichénologues, nous a été de quelque secours dans notre étude des corpuscules métachromatiques. Constitué par un mélange de :

Bleu de Poirrier, colorant le cytoplasme,
Teinture d'iode, colorant le glycogène,
Sudan III, colorant les graisses,

il nous a permis de démontrer que les corpuscules métachromatiques qui fixent le Neutralroth, peuvent également s'emparer du Sudan III, ce qui nous donne des indications sur la composition de ces corpuscules, que nous pensons être de nature lipoïdique. La recherche suivante corrobore d'ailleurs cette hypothèse. Nous avons mis en évidence ce fait que le bleu polychrome, colorant de choix des corpuscules métachromatiques, agité avec son volume de xylol (dissolvant des graisses) cède à ce dissolvant sa matière colorante rouge, tandis que la couche inférieure vire du violet au bleu pur. Ainsi donc, le xylol dissocie les principes colorants de la formule complexe du bleu de Unna en dissolvant un colorant rouge. D'autre part, dans la coloration par le bleu polychrome, les corpuscules métachromatiques se teintent en rouge. Nous en concluons, que la substance colorante soluble dans le xylol possède des affinités chromatiques pour les grains de volutine qu'elle colore.

La réfringence très spéciale de ces corpuscules, quand on les examine directement et sans coloration, leur affinité pour le Sudan III, leur colorabilité par le rouge neutre (théorie lipoïdique d'Overton), leur métachromasie spéciale vis-à-vis du bleu polychrome, nous permettent donc d'envisager la composition de ces corpuscules, comme étant de nature lipoïdique.

Jeu des phénomènes métachromatiques

Comment peut-on interpréter ce phénomène ?

Phénomènes lumineux. — a) Dans une première hypothèse, Kunstler et Busquet veulent voir dans ces corpuscules les nœuds d'un réticulum; autour de ces points nodaux, apparaissent les prétendus corpuscules métachromatiques, sous forme d'anneaux de diffraction, dont la coloration serait fonction de la lumière incidente. Comme les dimensions du réseau sont très petites, la forme des mailles n'aurait aucune importance. Cette hypothèse ne semble pas en rapport avec ce que nous connaissons actuellement de ces granulations. Dans *Endomyces*, par exemple, un certain nombre de

ces corpuscules sont libres dans le liquide vacuolaire, ce qui ne saurait être en accord avec l'hypothèse physique de Kunstler.

Impuretés colorantes. — b) Dans une deuxième théorie, A. Meyer suppose que la métachromasie de ces grains rouges ne serait pas fonction de la couleur employée, mais d'une impureté de cette couleur. Le bleu de méthylène ne renferme-t-il pas fréquemment un pigment rouge accessoire qui aurait une affinité plus considérable que le bleu pour les corpuscules de Babès ? Cette opinion serait, en somme, assez en concordance avec le fait signalé par nous, que le xylol est susceptible de dissocier dans le bleu de Unna les substances rouges et bleues.

Acidité des corpuscules métachromatiques. — c) Pour nous, l'explication du phénomène est ailleurs. Si dans certains cas la théorie de Kunstler permet de rendre compte des faits observés ; si la seconde hypothèse envisagée est parfois susceptible de vérification dans le cas d'un colorant impur (bleu de méthylène), ou complexe (bleu de Unna), il nous semble que la vraie solution, et la plus générale du problème, s'explique par une modification physique du principe colorant, en rapport avec la composition chimique particulière du corpuscule, comme nous l'expliquerons par la suite. Faut-il admettre que doués de réactions acides et fixant avec avidité les colorants, les corpuscules métachromatiques soient susceptibles de faire virer l'hématéine et l'hématoxyline au rouge, hypothèse conforme à ce qu'on observe en acidifiant ces solutions colorantes par l'acide acétique ? Mais comment alors expliquer que le violet de gentiane colore ces granulations en rouge, alors que les acides le font passer lui-même au vert ? En réalité si l'on agit avec précaution, on s'aperçoit que le changement de coloration est précédé par un dichroïsme très net. Cette expérience et celle qui résulte de l'acidification des solutions d'hématéine et d'hématoxyline par les acides faibles paraissent donc être en faveur de cette théorie. Cependant, cette acidification, même ménagée, n'apporte aucune modification dans la coloration des solutions de bleu de méthylène pur et de bleu de toluidine ; toutes deux employées à la recherche et à la démonstration des corpuscules métachromatiques. Ainsi donc, la théorie chimique, si elle permet d'expliquer dans certains cas le jeu des phénomènes métachromatiques, ne peut pas les expliquer tous.

Changement de nature physique. — d) L'hypothèse physique suivante paraît donner plus de satisfaction. Si l'hématéine, l'hématoxyline, les bleus de toluidine et de méthylène, et le violet de gentiane colorent en bleu ou en violet les solutions aqueuses, c'est que ces substances se trouvent dans un état physique spécial. Quand ces teintures vont se fixer sur les corpuscules métachromatiques de nature lipodique, ils passent d'un milieu où ils étaient ionisés dans un milieu où ils ne le sont plus, ce qui pourrait expliquer le changement de couleur observé. Ce phénomène est, en bien des points, comparable à celui que l'on observe avec les solutions d'iode, métalloïde qui colore les liqueurs alcooliques en jaune, tandis que les solutés chloroformiques sont violets. Cette observation démontre que la substance présente, sous sa forme moléculaire, une coloration différente de celle qu'elle possède dans un liquide où elle est dans un état d'ionisation plus ou moins accentué; expériences qui permettraient de considérer la métachromasie comme un phénomène physique.

B) *Méthode soustractive*

Mais lorsque nous disons que ces granulations appartiennent à la série des lipoides, nous ne savons absolument rien sur leur véritable constitution chimique. Sont-ce des phytostérines, des lécithides ou de simples glycérides d'acides gras ? La question est complexe. Nous avons pensé établir, en partie tout au moins, la composition élémentaire de ces formations en supprimant aux milieux de culture, dans lesquels végètent ces cellules, une ou plusieurs substances chimiques indispensables à leur édification cytologique. Mais ce mode opératoire ne nous renseigne qu'imparfaitement. Que l'on supprime, en effet, l'un des éléments chimiques utiles pour la végétation parfaite de la culture, et que dans ce nouveau milieu les corpuscules métachromatiques n'apparaissent pas, il ne s'ensuivra pas nécessairement que la substance chimique qui fait défaut, entre dans la composition de ces grains rouges, car l'absence de ceux-ci peut être simplement due à un ralentissement dans l'activité des phénomènes trophiques, sous la dépendance du noyau.

Ces réserves faites, nous avons employé les milieux suivants dans le but de savoir si les cellules utilisaient le phosphore pour

réaliser la synthèse de leurs corpuscules métachromatiques. La constatation de ces granulations était réalisée après coloration au rouge neutre en solution à 0.20 ‰.

Eau	1.000 gr.	} Soluté minéral α
Sulfate de magnésie.....	0 gr. 05	
Sulfate de fer	0 gr. 02	
Sulfate de zinc	0 gr. 02	
Sulfate d'ammoniaque	1 gr.	
Carbonate de Na	0 gr. 10	
Chlorure de K	0 gr. 20	

Eau	1.000 gr.	} Soluté minéral β
Sulfate de magnésie.....	0 gr. 05	
Sulfate de fer	0 gr. 02	
Sulfate de zinc	0 gr. 02	
Sulfate d'ammoniaque.....	1 gr.	
Carbonate de Na	0 gr. 10	
Phosphate de K	0 gr. 50	

Les solutions minérales α et β ne diffèrent l'une de l'autre que par la substitution dans β , du KCl par le Phosphate de K. α constitue donc le milieu aphosphoré. Tous deux renferment cependant du potassium, élément indispensable à la vitalité de la cellule. La nutrition hydrocarbonée du muguet était assurée par l'adjonction aux milieux α et β de saccharose ou de lactose, en sorte que l'on obtenait finalement les quatre solutions nutritives suivantes :

I Saccharose.....	3	
Soluté (α).....	150	Milieu Σ (α)
II Lactose	3	
Soluté (α).....	150	Milieu λ (α)
III Saccharose.....	3	
Soluté (β).....	150	Milieu Σ (β)
IV Lactose	3	
Soluté.....	β	Milieu λ (β)

Comme on peut s'en rendre compte, nous avons fait varier la composition hydrocarbonée des substrata.

Le métabolisme cellulaire étant troublé par la disparition du phosphore, nous avons supposé avec raison, comme on le verra par la suite, que les divers hydrocarbures pouvaient être utilisés plus ou moins parfaitement, et inégalement par la cellule. — Le protocole d'expériences est le suivant :

Milieu Σ (α). — Pas de développement appréciable. Tous les organismes observés, uniformément colorés en rose, proviennent sans doute de l'ensemencement primitif.

Milieu γ (α). — Rares formes filamenteuses, plus nombreuses formes levures. Corpuscules métachromatiques dans tous les éléments vivants.

Milieu Σ (β). — Développement abondant avec présence de nombreuses formes levures, quelques formes subfilamenteuses, quelques formes filamenteuses. Corpuscules métachromatiques dans tous les éléments.

Milieu λ (β). Quelques formes levures. Corpuscules métachromatiques dans tous les éléments.

De ces observations, nous déduirons donc :

I. Que le phosphore ne paraît pas indispensable à la formation des corpuscules métachromatiques (milieu α);

II. Que dans le milieu aphosphoré étudié, la cellule dont l'activité trophique est suspendue, paraît ne pouvoir utiliser le saccharose comme hydrate de carbone Σ (α).

Meyer pense cependant, que les corpuscules métachromatiques sont constitués par des nucléoprotéides; il se base sur ce fait que l'acide nucléique retiré des Levures par Kossel, présentait un certain nombre des réactions de la volutine, que lui-même il avait indiquées. Il explique les différences qui peuvent exister entre les réactions de ces granulations et celles de l'acide nucléique, par ce fait qu'il opère avec de l'acide nucléique pur. Il est probable, selon Meyer, que cet acide dont la levure est riche, ne provient pas du noyau très pauvre en chromatine. *A priori*, nous nous élevons contre cette conception de Meyer. Entre autres inclusions, la cellule de levure renferme en effet des grains de sécrétion, sidérophiles en abondance, ainsi que l'ont démontré Janssens, Kohl, Guilliermond et nous même, dans *Endomyces albicans*. Nous ne serions pas étonné que l'acide nucléique isolé des Levures puisse provenir en partie de

cette formation basophile, plutôt que des corpuscules métachromatiques.

Guilliermond, de son côté, a essayé d'apporter une contribution à l'étude chimique de ces granulations, en supprimant les hydrocarbones et l'azote aux milieux cultureux. Il lui a semblé que ces substances n'intervenaient pas dans l'édification moléculaire des grains de volutine.

Cette méthode soustractive, pas plus que la microchimie, ne permet donc de résoudre le problème.

i

C) *Méthode mixte*

III. La méthode suivante, que nous aurions voulu pouvoir expérimenter, nous paraît susceptible de fournir des indications précises dans l'étude plus particulière de ces corpuscules, surtout si l'on choisit comme matériel d'observations les levures qui se cultivent plus aisément qu'*Endomyces albicans*. Sur ces cellules convenablement fixées par l'alcool absolu, par exemple, afin d'éviter l'action altérante des réactifs chimiques, on pourrait faire agir comme dans les recherches pharmacologiques, des drogues simples, différents solvants volatils (CS², éther de pétrole, éther,), et se rendre compte, après coloration des éléments ainsi traités, des formations cytologiques qui ont disparu de la cellule. Etudier les résidus d'évaporation des liquides employés, mais, cette fois, en se conformant aux règles précises décrites en chimie biologique sans avoir à craindre les traumatismes cellulaires. Ce mode opératoire permettrait ainsi de déterminer d'une façon précise, la composition chimique des formations dissoutes, et en particulier des corpuscules métachromatiques s'ils sont solubles. L'étude microchimique complète de ces grains nous aurait fait dévier considérablement du chemin que nous nous étions tracé. Nous nous proposons d'y revenir plus tard.

FORMATION BASOPHILE

INTRODUCTION

La plupart des auteurs qui s'occupent de cytologie emploient surtout l'hématoxyline au fer dans l'étude fine du noyau. Cette méthode, qui donne sans doute de fort belles définitions nucléaires

dans les cellules à structure simple, ne sauraient être employées seules et avec le même succès chez les Levures ou Bactéries qui cumulent, malgré l'apparente simplicité de leur morphologie externe, les grandes fonctions physiologiques des organismes multicellulaires. Il s'ensuit nécessairement une très grande complexité de leur structure intime puisqu'ils sont le siège de phénomènes d'assimilation se traduisant par l'apparition dans le cytoplasme, de vacuolès glycogéniques, de grains de volutine, de gouttelettes grasses et de granulations basophiles; puisque le noyau subit une rapide bipartition aboutissant à la formation de bourgeons ou de tronçons uninucléés; puisqu'enfin, au déclin de leur existence, quand les conditions extérieures deviennent défavorables, un certain nombre de ces organismes sont susceptibles de fournir des spores, suivant un mécanisme plus ou moins complexe. Cette multiplicité de formations cytologiques oblige l'observateur à recourir à différentes fixations et colorations. Par la superposition des figures obtenues aux stades successifs de l'évolution, il pourra étudier le sort, et, peut-être, la nature de ces différentes formations. Cette remarque s'applique plus particulièrement à la formation basophile d'*Endomyces*, qui s'offre sous des aspects tellement différents qu'elle peut être confondue avec le noyau lui-même, ou bien présenter l'allure d'un réseau diffus, aux nœuds duquel sont disposées des granulations basophiles, qui masquent l'organite nucléaire ou son caryosome. Ainsi donc, il serait possible, en se servant de l'hématoxyline ferrique ou du bleu polychrome dans certains cas, de mettre en évidence dans le muguet un véritable noyau diffus, en tous points comparable à celui décrit par Schaudinn, dans *Bacillus Butschlii*, ou ceux observés par Guilliermond dans les Bactéries endosporées, et nous-même dans *Bacillus megatherium* et *Bacillus anthracis*.

La méprise serait d'autant plus aisée, qu'à tous les stades de l'évolution, depuis le deuxième jour jusqu'au septième, cette formation apparaît constamment dans la cellule. Chez les Levures, il est possible à un certain stade d'observer, autour de la vacuole à corpuscules métachromatiques, un système de granulations basophiles, réunies entre elles par des tractus (observation de Janssens et Leblanc, observation de Wager, et de Guilliermond, de Kohl), véritable réseau transitoire répondant aux mêmes caractères que ceux de notre réticulum basophile. Mais la courte apparition de cette

formation basophile dans les levures est un argument en faveur de la nature extranucléaire du réticulum d'*Endomyces albicans*.

COLORATIONS

Une étude plus approfondie des colorations permet d'ailleurs de lever les doutes à cet égard et de solutionner le problème. L'hématéine, en effet, ne colore pas ces granulations et fournit avec précision le noyau et les corpuscules métachromatiques, ou le noyau seul, suivant la nature des fixateurs employés. Ainsi donc, l'hématéine, teinture nucléaire moins diffuse que la laque ferrique, ne met pas en évidence la formation basophile. D'autre part, après fixation des cellules à l'alcool absolu et coloration au bleu polychrome, ce réticulum apparaît coloré en rouge comme les corpuscules métachromatiques. Ce ne sont pourtant pas des corpuscules métachromatiques, puisque l'hématéine, dans les mêmes conditions de fixation, ne les décèle pas et que cette formation basophile ne prend pas les colorants vitaux.

Ce ne sont pas davantage des systèmes nucléaires ou des noyaux, puisque ceux-ci sont teintés en bleu par la solution de Unna. La métachromasie de cette formation n'apparaît qu'après fixation des cellules à l'alcool et coloration au bleu polychrome. Après stabilisation des éléments par le Bouin ou le Lavdowsky, le réseau est coloré en bleu. Le caractère amphophile de ce réticulum ne saurait appartenir à une véritable formation nucléaire. Ce réseau, de par ses propriétés chromatiques, se différencie très nettement du noyau et des corpuscules métachromatiques. Ses caractères morphologiques, hautement différenciés, accentuent encore cette dissemblance.

FIXATION

Nous dirons un mot de sa fixation. Elle s'effectue très convenablement avec les différents fixateurs, à la condition de prolonger la durée de cette opération de 18 à 24 heures, puis d'effectuer un passage dans l'alcool à 95°. Les fixations directes, par l'alcool ou le sublimé alcoolique, produisent une rétraction du réticulum avec formation de gros amas muriformes, artefact, qui modifie considérablement la morphologie de ce réticulum.

MORPHOLOGIE

La formation basophile, malgré son polymorphisme est susceptible d'être ramenée à un certain nombre de types bien déterminés, desquels dérivent tous les autres.

Dans un premier stade, elle se présente sous la forme d'un corpuscule, qui ne tarde pas à augmenter de volume et à se transformer en une rosette irrégulière, formée par la congglomération de granules, qui paraissent avoir la même importance morphologique, et, sans doute, la même valeur physiologique. Quand la cellule est en voie de bourgeonnement, un petit grain de la morula basophile se détache et se dirige vers l'évagination cytoplasmique, tout en restant relié au groupement originel par un fin tractus; puis sur ce filament de liaison vont glisser successivement un, puis deux et trois granules, si bien que le jeune bourgeon va posséder un système de trois ou quatre granulations basophiles, issues de la cellule mère. Quand deux bourgeons naissent simultanément sur la même cellule, deux systèmes linéaires apparaissent qui transmettent aux bourgeons les grains de la formation basophile.

Quand cet amas est situé à l'un des pôles de l'oïdie et que celle-ci n'est pas en prolifération, un rapide épanouissement de la morula sidérophile s'effectue dans tous les sens. Cette masse projettera contre la paroi cellulaire, des petits grains qui resteront, toutefois, réunis au centre d'épanouissement par de fins tractus, d'où l'aspect rayonnant du réticulum. Cette forme se retrouve également et avec plus de netteté encore, lorsque le morula initiale occupe une position équatoriale dans la cellule. L'épanouissement, extrêmement rapide dans ce cas, se traduit par une véritable explosion de la morula basophile. Ce phénomène expansif peut s'effectuer parfois avec moins de rapidité. De la masse initiale s'échappe d'abord un petit grain et sur le tractus de liaison glissent un, puis deux granules; enfin cette ligne se brise et chaque angle va se trouver occupé par un grain basophile, échappé de la colonie granuleuse originelle. En d'autres points de la morula, des systèmes linéaire granuleux semblables vont se former, si bien que le cytoplasme va se trouver parcouru par un réseau d'allures et de formes plus ou moins irrégulières. Il est parfois possible de noter, sur une des parties du réticulum, un amas de granules qui représentent, sans doute, la masse

initiale, non encore dissociée; le parfait épanouissement du réseau ne se retrouvant guère qu'au cinquième jour, dans les cellules ayant perdu leurs corpuscules lipoïdiques de réserve.

NATURE

Nous ne savons que peu de choses sur la nature de ce réticulum; sa non colorabilité par le bleu de méthylène, le rouge neutre et les autres teintures vitales, nous permet de supposer qu'il joue un rôle plus noble que celui de granulations alimentaires de réserve. Sa participation dans le bourgeonnement milite en faveur de cette hypothèse. Quant à sa métachromasie par le bleu de Unna, après fixation à l'alcool; étant donné ce que nous savons sur les indications du liquide de Unna, nous croyons possible qu'il entre dans son complexus moléculaire quelques radicaux d'acide gras, impressionnés par cette teinture dans certaines conditions de stabilisation. Sa coloration par l'hématoxyline ferrique, pourrait faire penser que l'on se trouve en présence d'une formation de nature ergastoplasmique. Ce dernier point serait intéressant à élucider.

CHAPITRE IV

CYTOLOGIE D'ENDOMYCES ALBICANS

(FORMES FILAMENTEUSES)

INTRODUCTION

Dans l'étude de la forme levure, nous nous étions attaché à décrire la cytologie d'*Endomyces*, après culture de cet organisme sur des substrata naturels particulièrement riches. La présence d'une triple formation cytoplasmique comprenant, pour chaque cellule, un noyau, des corpuscules métachromatiques compris dans une vacuole, et un réticulum basophile parfaitement net, nous a engagé à poursuivre cette étude.

Nous nous sommes alors demandé si la formation sidérophile ne résultait pas simplement d'une accumulation, dans la cellule, de substances de réserve, sous l'influence de conditions eutrophiques particulières; conditions qui pourraient ne pas être réalisées en cultivant cet organisme sur des milieux différents. Il est en effet classique d'admettre que les formes filamenteuses apparaissent lorsque les milieux nutritifs sont moins riches, ou qu'ils renferment des hydrates de carbone moins bien utilisés par le champignon. Ceci étant posé, nous avons voulu savoir si, dans ces nouvelles conditions biologiques, moins favorables, les corpuscules métachromatiques et la formation basophile subsisteraient dans la cellule. Le réticulum n'y ferait-il pas comme dans les levures, une courte apparition, pour disparaître ensuite, ainsi que l'ont démontré Janssens et Leblanc? c'est ce que nous allons étudier.

SUBSTRATA

Les cultures sur pommes de terre fournissent, à côté de nombreuses formes levures, quelques rares formes filamenteuses, mais ces derniers aspects morphologiques se trouvent en plus grand nombre sur les milieux saccharosés, gélosés, précédemment décrits.

TECHNIQUES

Nous nous sommes servi, dans cette étude, des mêmes procédés de fixation et de coloration qui nous ont donné de si bonnes préparations au cours de nos précédentes recherches sur les formes levures d'*Endomyces*. Nous allons étudier successivement les différents aspects observés dans ces formes filamenteuses qui présentent, comme nous le verrons ultérieurement, les mêmes formations cytoplasmiques que celles décrites dans les formes oïdiennes du muguet.

Colorations vitales. — Les colorations au rouge neutre mettent en évidence, au deuxième jour du développement, des granulations qui fixent avec avidité ce colorant. La distribution de ces corpuscules dans les cellules est très variable. En général, circulaires et nets, ils se détachent sur le fond incolore de la cellule, qui apparaît parfaitement homogène et dépourvu de structure. Les granulations érythrophiles affectent, tantôt un aspect moniliforme, tantôt elles sont échelonnées sur toute la longueur du filament, les granulations polaires, plus volumineuses, occupant la largeur de l'élément: A ce stade, il est parfois possible, mais plus rarement, d'observer des cellules munies de vacuoles et présentant des corpuscules métachromatiques, sous forme de calotte d'ellipsoïde, situés aux pôles de la vacuole, intimement adossés à la limite vacuolaire et inclus dans cette alvéole. Enfin, dans un certain nombre d'éléments, un corpuscule réfringent, non coloré, et un seul par filament pourrait figurer le noyau.

La multiplication de ces corpuscules érythrophiles paraît se faire très simplement. Il ne semble pas qu'il y ait un véritable étirement du corpuscule mère, qui conserve toujours sa forme sphéroïde, mais de sa masse paraît sourdre une petite granulation qui se détache ensuite, s'éloigne de l'organite maternel et grossit rapidement pour son propre compte.

Au quatrième jour du développement, la vacuole apparaît dans tous les éléments. Dans cette vacuole, faiblement teintée en rose, on aperçoit des granulations érythrophiles agitées de trémulations browniennes, ou bien des corpuscules polaires et en calottes analogues à ceux décrits ci-dessus. Dans tous les éléments apparaît également le noyau, incolore, en rapport avec la vacuole à grains de volutine.

Cet aspect ne tarde pas cependant à se modifier; au sixième-septième jour les vacuoles se montrent plus fortement teintées en rouge, et ne renferment plus de corpuscules métachromatiques. Cette disparition des grains rouges correspond à une diminution de l'activité cellulaire. En revanche, on voit apparaître, dans le cytoplasme, des granules réfringents, multiples, et certainement de nature extranucléaire, puisque les préparations fixées et colorées par les teintures basiques ne décèlent que rarement la présence de filaments multinucléés.

Coloration après fixation. — Si les colorations vitales sont susceptibles de donner quelques indications sur la nature du contenu cellulaire, les résultats qu'elles fournissent sont relatifs et incomplets. Pour ce qui a trait aux corpuscules métachromatiques, nous avons vu que dans les filaments très jeunes, au premier et deuxième jour du développement, la vacuole dans laquelle se trouvaient inclus ces corpuscules échappe à l'observation par suite de la densité du cytoplasme à cet état, tandis que les préparations fixées et colorées mettent en évidence, avec précision, une vacuole ou un système vacuolaire. En ce qui concerne le noyau, cet organite n'est pas visible dans tous les éléments. D'autre part, il apparaît sous forme d'une tache réfringente et homogène, caractère qui pourrait aussi bien appartenir à un corpuscule lipoïdique. Enfin, fait plus grave, la structure du cytoplasme échappe à l'observateur, la présence du réticulum basophile n'est même pas soupçonnée, ce qui tient sans doute à ce fait, que la réfringence des granules basophiles est très voisine de la réfringence cytoplasmique. Nous ne saurions donc trop nous élever contre la mauvaise habitude qu'ont certains observateurs de s'adresser uniquement aux colorations vitales dans l'étude du contenu cellulaire des microorganismes; méthode par trop simpliste qui est la source d'erreurs grossières. Lorsqu'il s'agit d'organismes à morphologie interne aussi complexe, il est de toute nécessité de faire usage de nombreux fixateurs et colorants et de comparer les indications qu'ils peuvent fournir. Nous ne voulons pas méconnaître l'utilité des colorations vitales, mais elles ne doivent pas, à notre avis, constituer une méthode essentielle, absolue, primordiale, mais seulement secondaire et adjuvante, l'exemple ci-dessus le prouve très nettement.

NOYAU

Le noyau présente les mêmes caractères morphologiques que ceux décrits dans les formes levures du muguet, à savoir : noyau vésiculeux très simple comportant un caryoplasme limité par une membrane nucléaire. Dans le caryoplasme, un seul caryosome, généralement situé au centre de la vésicule nucléaire, mais parfois aussi, disposé excentriquement. Ce noyau peut aussi se présenter sous la forme d'un corpuscule plein, dense, homogène, ce qui tient sans doute à une différenciation insuffisante des préparations dans les liquides de régression.

Le noyau, est, en général, en contact intime avec la vacuole. Il peut également être localisé au centre du filament entre deux vacuoles ou systèmes vacuolaires, qui occupent alors les extrémités de l'élément. Nous pensons d'ailleurs, que la position de cet organite n'est pas immuablement fixée dans la cellule, il évolue dans le cytoplasme, et ses mutations sont évidemment en rapport avec les phénomènes de division cellulaire; dans les cellules en voie de fragmentation scissipare, cet organite occupe en effet le milieu de l'élément, tandis que dans les filaments qui sont sur le point de bourgeonner, le noyau occupe au contraire l'un des pôles de la cellule, au voisinage du jeune bourgeon qui a pris naissance, se transportant ainsi à l'endroit de l'organisme où siège l'activité maxima.

Les observations suivantes semblent d'ailleurs démontrer péremptoirement le rôle puissamment trophique que joue le noyau dans la cellule d'*Endomyces*. Dans les préparations colorées à l'hématoxyline ferrique, il est à peu près impossible de repérer la position de cet organite, lorsque l'on tient à mettre en évidence, simultanément, le réticulum sidérophile, ce qui oblige à ne pas pousser les régressions. C'est qu'en effet, le noyau se trouve masqué par un agglomérat de granulations basophiles appartenant au réticulum, ou par la morula basophile elle-même, lorsque l'expansion de cet amas muriforme ne s'est pas encore effectué. Ce qui donne de la force à cette conception, c'est qu'il est parfois possible de retrouver noyau et réticulum sur les préparations fixées à l'alcool et colorées au bleu de Unna. On sait que dans ces conditions, il se produit, sous l'action du stabilisateur, une véritable rétraction portant avec élection sur le réticulum,

ce qui permet de découvrir l'organite nucléaire, dont la couleur bleue se différencie aisément de celle de la formation basophile qui présente dans ces conditions une métachromasie rouge, très nette. Ainsi donc, dans les conditions normales de fixation (Bouin; Perenyi) et de coloration à l'hématoxyline au fer, le noyau échappe. Il peut être masqué par deux raisons : soit qu'il se confonde avec un grain du reticulum basophile, soit qu'il se trouve caché par un conglomérat de ces granulations. D'après les nombreuses observations auxquelles nous nous sommes livré pour éclaircir ce dernier point, il nous semble que la dernière hypothèse rend mieux compte des faits. C'est que les formes purement réticulées, dans lesquelles la cellule est parcourue par un système de granulations basophiles, parfaitement indépendantes, distinctes et individualisées, réunies par des tractus grêles sont rares. Presque toujours, il est possible de noter, en dehors d'un réseau plus ou moins épanoui, un amas souche granuleux, d'importance variable, qui masque le noyau, comme si cet organite avait, entre autres fonctions, celle de présider à l'élaboration de la formation basophile.

La division nucléaire très simple a été longuement étudiée dans les formes levures. Evagination de la vésicule caryoplasmique dans le cytoplasme, allongement du caryosome qui devient clavulaire, puis se rompt par étirement, membrane et caryoplasme suivant le caryosome dans ce processus, enfin, individualisation des noyaux fils. La division cellulaire consécutive peut être égale, auquel cas le filament se scinde transversalement (division, scissipare) ou inégale, et alors le filament se sépare du bourgeon (Division bourgeonnante).

CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES

Les préparations au bleu polychrome après fixation au Bouin, mettent en évidence ces corpuscules avec une netteté particulière. Les résultats du même ordre sont obtenus avec l'hématéine, mais alors qu'avec la solution de Unna les noyaux n'étaient que peu ou pas colorés, avec l'hématéine, au contraire, ils apparaissent parfaitement définis. Dans les préparations au septième jour du développement, les corpuscules métachromatiques sont rares, ce qui est bien en accord avec l'hypothèse qui fait de ces granulations des subs-

tances de réserve, fonction d'une hyperactivité cellulaire. En fait, la prolifération sur les milieux gélosés demeure strictement limitée à la strie d'ensemencement, cependant que le développement atteint son maximum pour demeurer ensuite sensiblement stationnaire (troisième jour de culture). A partir de ce moment, le métabolisme cellulaire se ralentit, les phénomènes de prolifération se raréfient, l'activité de l'élément décroît; il utilise ses réserves de métachromatine, qui disparaissent.

FORMATION BASOPHILE

Le polymorphisme de cette formation cytologique est encore plus important ici que dans les formes levures, puisque sur notre milieu gélosé apparaissent en outre, tous les aspects compris entre l'oidie et le filament. Nous ferons la même remarque que précédemment relativement à l'action de l'alcool comme fixateur; action brutale qui amène, comme nous l'avons déjà dit, d'importantes modifications dans la structure de la cellule (rétraction du réticulum basophile et projection des corpuscules métachromatiques en dehors des vacuoles). Ces réserves faites, le réticulum apparaît avec une netteté incomparable après les fixations ordinaires par le Bouin, le Perenyi, le fixateur acétoformique et les colorations à l'hématoxyline au fer. Le violet de gentiane met également en évidence ces granulations, mais sous un aspect plus condensé qu'après emploi de la laque ferrique, puisque cette teinture d'aniline ne donne de résultats satisfaisants qu'après emploi de l'alcool comme fixateur. D'autre part, elle ne colore pas les tractus reliant ces granulations.

A l'origine, la formation basophile, masse sphéroïde puis muriforme projette contre la paroi cellulosique un petit granule, puis deux, qui sont toujours réunis, par de fins trabécules, à la colonie granuleuse originelle; souvent aussi, cette morula initiale émet simultanément et de tous les côtés à la fois, un ensemble de grains identiques, ce qui explique la structure radiée du réseau dans certaines formes subfilamenteuses. Parfois, en avant-coureurs, elle dépêche aux extrémités de la cellule un ou plusieurs granules qui restent reliés à la masse basophile par de fins tractus; puis l'épanouissement de la morula sidérophile s'effectue de proche en proche, pour aboutir à la formation d'un réticulum d'allure et de forme caractéristiques

présentant dans son ensemble un aspect tantôt radié, tantôt scaliforme. Dans les éléments très jeunes, les grains sont excessivement serrés et disposés aux extrémités des branches d'un réseau figurant une cyme florale ou une arête de poisson. Enfin, dans la plupart des cellules, la formation initiale subsiste sous forme d'un conglomérat qui masque le noyau ainsi que nous l'avons déjà dit.

Comment va se comporter cette formation au moment de la division cellulaire? Pour ce qui a trait aux filaments qui bourgeonnent, on voit sourdre de la masse basophile un petit granule basophile qui s'éloigne de la colonie originelle, tout en restant relié à elle, par un fin pédicule. Quant à la division par scissiparité, il nous semble qu'on assiste dans ce cas à une véritable régression morphologique qui aboutit au type muriforme primitif. Ce stade précédant la division cellulaire.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DES BACTÉRIES

INTRODUCTION

L'étude structurale des Bactéries a été entreprise par un grand nombre d'observateurs, mais de toutes les hypothèses qui ont été formulées, il y en a peu qui aient donné, jusqu'à présent, des résultats définitivement acquis à la science. La difficulté de cette étude réside en ce fait que les Bactéries constituent des organismes de très petite taille, et par suite d'observation très délicate. Malgré la simplicité de leur morphologie externe, les Bacilles comportent une structure compliquée, comme nous le verrons par la suite, puisqu'ils cumulent dans le cytoplasme à un stade déterminé de leur développement, trois formations protoplasmiques comprenant un noyau plus ou moins défini, des corpuscules métachromatiques et un réticulum basophile diffus. A d'autres stades, les corpuscules métachromatiques apparaissent seuls, tranchant nettement sur le fond dense et homogène du cytoplasme, tandis que le réticulum et le noyau ne sont pas visibles ou n'existent pas. Cette complexité dans l'évolution, jointe à la multiplicité des formations cytoplasmiques permet de saisir les contradictions nombreuses auxquelles sont parvenus les différents observateurs. Si nous ajoutons que parfois, ces études de Bactériocytologie ont été entreprises par des morphologistes, au lieu d'être poursuivies par des histologistes, on comprendra plus aisément les résultats parfois étranges qui ont été publiés. On ne saurait, d'autre part, trop insister sur ce fait, qu'il est difficile, sinon impossible, de diagnostiquer les trois formations cytoplasmiques désignées, et

encore plus de suivre leur évolution par l'emploi d'un stabilisateur unique et d'une seule teinture nucléaire, ce qui est pourtant le cas le plus fréquent. Devant les résultats contradictoires obtenus par des observateurs consciencieux, opérant sur des Bacilles identiques, nous nous sommes proposé d'approfondir la structure de quelques Bactéries endosporées en nous servant des techniques qui nous avaient donné de si bons résultats dans l'étude d'*Endomyces albicans*.

L'étude des Bactéries endosporées est intéressante à un autre point de vue, car elle pourrait mettre les cytologistes sur la voie d'une classification rationnelle de ces organismes. Les Bactéries constituent en effet une classe à part en Systématique. En se basant uniquement sur des similitudes morphologiques, on a sans doute pu délimiter dans cette grande classe : les Microcoques, les Bacilles et les Spirilles ; mais cette classification, qui se base uniquement sur la forme extérieure des organismes, n'a d'autre valeur que d'aiguiller le chercheur dans la voie de ces délicates diagnoses. Encore faut-il qu'il soit guidé dans ses recherches par les propriétés bio-chimiques des Bacilles qu'il étudie. Existe-t-il, d'ailleurs, réellement un lien entre les Bacilles endosporés et les Bacilles asporés ? Existe-t-il une certaine filiation entre les Asporés et les Spirilles, entre les Bacilles et les Cocci ? question mystérieuse et toujours discutée. Peut-on retrouver des termes de passage entre certaines formes bacillaires sub-filamenteuses ou mycobactéries et les *Oospora* ? problème encore non résolu, étude délicate que les recherches cytologiques permettront peut-être d'élucider un jour.

CHAPITRE I

HISTORIQUE

Wager [60] (1891) décrit dans une bactérie isolée de l'eau, colorée par la fuschine, un noyau, avec membrane nucléaire, et deux caryosomes se divisant amitotiquement. A un certain stade, la division nucléaire se fait irrégulièrement, puis le noyau se fragmente en granules devenant épars dans le cytoplasme. Cette dissociation nucléaire précède la formation de la spore.

Protopopoff [48] (1891) observe dans une bactérie une ou plusieurs granulations que l'auteur assimile à des grains de chromatine, mais qui doivent être considérées comme des corpuscules métachromatiques.

Un peu plus tard (1892), Trambusti et Galéotti [57], étudiant un bacille isolé de l'eau, remarquent que dans le première partie de son existence, cet organisme possède un cytoplasme homogène et dense; plus tard, ils aperçoivent dans le corps cellulaire des tractus occupant l'axe longitudinal de la cellule et se résolvant en granule disposés à la périphérie des bâtonnets. Ces granules finissent par former trois sortes de couronnes moniliformes qui constituent les ébauches des spores futures.

A la même époque (1892), Sjöbring [52] observe dans *Bacillus anthracis* deux sortes de granulations : les unes nombreuses et périphériques, prenant avec avidité le magenta, les autres incluses dans des vacuoles fixant électivement le bleu de méthylène.

Dans cette même bactérie charbonneuse, Ilkewicz (1894) décrit dans les spores de cet organisme un noyau net, mis en évidence après des fixations à l'acide osmique et coloration au Kolossow.

Dans une série d'importantes recherches sur la cytologie des Cyanophycées et des Bactériacées, Bütschli [4] observe dans les *Beg-*

giatoo, *Chromatium*, *Ophidiomonas* et les Sulfobactéries de grande taille, l'existence d'un corps central occupant la presque totalité de l'élément, si bien que celui-ci se trouve constitué par un noyau volumineux, limité à la périphérie par une zone excessivement mince de protoplasme. Cette structure est à rapprocher, en certains points de celle qu'il observe dans les Cyanophycées. Ici également l'auteur met en évidence une partie centrale fixant électivement les colorants nucléaires et constituant un noyau rudimentaire de grande dimension (1891-1896-1902).

Meyer [42] (1897) observe dans *Astasia asterospora*, des noyaux qui doivent être considérés comme des corpuscules métachromatiques. Ce même auteur (1899), étudiant les *Bacillus subtilis* et *tumescens* le *Granulobacter*, met en évidence, dans une oïdie adulte de ce dernier bacille, cinq noyaux vésiculeux, à côté de vacuoles grassieuses qui demeurent incolores. Au moment de la germination des spores les bâtonnets paraissent homogènes, présentent un ou deux noyaux de taille volumineuse qui aboutissent, après des divisions successives, à la formation d'une hexanucléose. La spore est également uninucléée tandis que le cytoplasme présente encore un noyau extrasporaire inutilisé.

Kunstler et Busquet [33] (1897) admettent que le corps central de Bütschli ne doit pas être considéré comme un noyau véritable, dont il ne présente pas les propriétés chromophiles. Ils interprètent les travaux du savant allemand en admettant que la partie centrale ne représente que du protoplasme plus coloré.

Vejdovsky [58] (1900), dans *Bacterium gammari*, colorant à la laque ferrique et au vert lumière, observe, au milieu de la cellule, une large zone de cytoplasme, au centre de laquelle se trouve le noyau. Les pôles de l'élément sont occupés par des vacuoles entrecoupées par des ponts cytoplasmiques; à la périphérie du bacille ce cytologiste met en évidence des corpuscules métachromatiques. Le noyau se divise par caryocinèse, avec plaque équatoriale et pseudo-centrosomes. Caullery et Mesnil s'élèvent contre la place occupée dans la systématique par le bacille de Vejdovsky et rangent cet organisme dans les Levures.

Poursuivant ses recherches, Vejdovsky [59] (1904) isole d'un Annélide, une bactérie filamenteuse. Les articles terminaux paraissent dépourvus de noyaux. Au repos, on constate une série de vacuoles sépa-

rées par des travées plus ou moins granuleuses, que Vejdovsky assimile à des plaques polaires de mitose. Rarement, l'auteur observe une masse nucléaire unique, circulaire et morphologiquement définie. Dans les cellules plus âgées, le noyau est remplacé par un système chromidial.

Kunstler [34] (1900) poursuivant ses recherches, suit le développement des spores de *Bacteriodomonas sporifera*. Au début du développement, ces organites ont l'aspect d'un noyau indéniable, puisqu'ils sont doués des mêmes propriétés chromophiles. Dans une deuxième période, pendant laquelle les phénomènes vitaux se ralentissent, le corps de la spore est contracté, devient réfringent, ses réactions micro-chimiques ne sont plus constatables.

Nakanischi [44] (1901), colorant au bleu de méthylène B. B. des staphylocoques, les bacilles de la peste ou du charbon, le *B. Subtilis* et le *Tuberculosis*, le *prodigiosus* et le *Megatherium*, observe dans toutes les Bactéries jeunes un noyau bien caractérisé, se divisant par amitose et prenant avec avidité les colorants bleus.

Les dates 1902-1903 sont particulièrement importantes en ce qui concerne la cytologie des Bactériacées. Le grand protistologiste allemand Schaudinn [51] étudie *Bacillus Bütschlii*, isolé de la Blatte, et observe à l'état vivant cette grosse Bactérie, qui présente un cytoplasme alvéolaire avec de nombreuses granulations dans la trame.

Après des fixations au sublimé alcoolique et des colorations à la laque ferrique, Schaudinn met en évidence la même structure alvéolaire et des granulations chromatiques disposées aux nœuds du réticulum cytoplasmique. L'auteur n'observe pas de noyau, ou tout au moins il ne croit pas les observer. En réalité, *Bacillus Bütschlii*, au moment de la germination de la spore, présente un ou deux organites basophiles sous forme de petits granules polaires qui ne peuvent être mis en évidence que sur les préparations fixées et colorées. Ce sont là des caractères de noyau. Ces granules chromatiques disparaissent ultérieurement au cours du développement. Schaudinn ne se prononce pas sur leur nature.

Au moment de la division cellulaire, une cloison vivement chromatique apparaît au milieu de la cellule et qui se délamine transversalement.

La sporulation de cet organisme est intéressante. La cellule qui

va sporuler est en effet le siège d'une division incomplète, par la formation d'une cloison transversale, transitoire, puisqu'elle se résorbe, sans qu'on puisse noter de scissiparité cellulaire. Schaudinn interprète ceci comme un acte sexuel dégénératif, une véritable autogamie, qui est le résultat de la fusion de deux gamètes identiques provenant du même élément. Il observe ensuite une véritable convergence de grains chromatiques vers les pôles de l'élément, en sorte qu'à ce stade, le noyau diffus se trouve remplacé par un noyau agrégé; celui-ci s'entoure d'une couche de cytoplasme, tandis qu'une membrane apparaît qui délimite le contenu de la spore.

Entre les deux spores polaires ainsi constituées, des grains de chromatine inutilisés subsistent sous forme d'un chapelet hélicoïdal; on aurait donc affaire dans *Bacillus Bütschlii*, à un véritable système chromidial diffus.

Dans un deuxième mémoire, Schaudinn étudie le *Bacillus sporonema*. A l'état jeune, le cytoplasme est alvéolaire, tandis que la trame est remplie de granulations réfringentes. La division cellulaire, scissipare s'effectue à partir d'une petite cloison transversale, qui est le siège d'une délamination qui partage l'élément. La spore se concrète au milieu du Bacille et se présente à l'état jeune sous forme d'une grosse granulation présentant une vive affinité pour les colorants chromatiques. Elle ne paraît pas être le résultat d'un agglomérat des granules basophiles nucléaires qui se retrouvent dans le cytoplasme après la formation de la spore.

Matruchot et Molliard [35] (1902) décrivent dans une algue verte *Stichococcus bacillaris*, des corpuscules métachromatiques inclus dans des vacuoles, et un noyau parfaitement net, se divisant par amitose. A certains stades, les auteurs signalent dans le cytoplasme des travées d'une substance basophile (qui semblerait résulter d'une transformation nucléaire) et qui ne sont pas visibles sur le vivant.

Hertwig [24-26] (1902), dans une série importante de recherches poursuivies chez les Protistes et dans *Acinospherium* en particulier, démontre que lorsque le noyau grandit et atteint une certaine dimension, cet organite se décharge d'une partie de sa chromatine, sous forme de granulations basophiles ou chromidies, afin que le rapport du noyau au protoplasme (kernplasmarelation) demeure constant. Les chromidies constituent donc un mécanisme régulateur des relations caryoplasmiques.

Federowitsch [15] (1902), étudiant les *Bacillus megatherium*, *pyocyaneus diphthericus*, colorant au violet de gentiane ou à la safranine, observe dans les Bactéries endosporées des granulations paraissant destinées à l'élaboration des spores. Chez les Bacilles asporées, l'auteur met en évidence des organites semblables, qu'il désigne sous le nom de spores élémentaires ou protospores, qui permettraient à la cellule de résister aux conditions défavorables du milieu extérieur. Ces granulations doivent être, d'après nous, assimilées aux corpuscules métachromatiques.

A la même année, Ernst [12], étudiant un grand nombre de Bacilles et de champignons, et en particulier les Bacilles du charbon et cyanogène, après des colorations vitales au rouge neutre ou au bleu de méthylène, met en évidence des granulations qui, tantôt prennent ces colorants, tantôt ne les prennent pas.

Caullery et Mesnil [6] fixant au Bouin, colorant à l'hématéine ou au bleu de Laveran, *Faellingieria aciniarum*, décrivent dans cet organisme : 1° un noyau dense, en forme de fer à cheval et formé par un assemblage de grains chromatiques. Ce noyau évolue ultérieurement vers un système chromidial par épanouissement de la chromatine. Enfin, à certains stades, il est possible, comme dans les Opalines, de mettre en évidence des cellules multinucléées.

Preisz [47 bis] observe dans la Bactéridie charbonneuse des noyaux volumineux et sphériques, à côté de corpuscules métachromatiques situés dans des vacuoles acido-résistantes. La spore prend naissance aux dépens d'une masse protoplasmique renfermant un noyau. La partie centrale de cette préspore devient la spore proprement dite, tandis que la périphérie en devient l'enveloppe. L'auteur colore ces organismes au violet de gentiane aniliné, ou à la fuschine acide, et régresse dans l'acide sulfurique étendu.

A la même époque, 1904, Kunstler et Gineste [31] mettent en évidence dans un spirille, parasite de la Blatte, une sorte de vésicule nucléaire, présentant les caractères morphologiques du noyau de la Bactérie de Vejdovsky.

Karel Kruis et Rayman [30] (1904), fixant dans le vide sulfurique les *Bacillus mycoides*, *radicosus*, *oxalaticus*, *lumescens*, colorant à la laque ferrique et à la purpurine, décrivent dans les cellules jeunes, au début du développement, un noyau sous forme d'un granule assez volumineux et très coloré. Il est parfois possible d'observer

deux granules très rapprochés rappelant dans leur disposition un stade diastroïde de mitose. Dans la suite du développement, cette formation s'efface, disparaît, et se trouve remplacée par une formation alvéolaire très nette.

Mencl [37] (1905), étudiant les eaux de la Moldau, décrit des espèces se rapprochant des *Cladothrix*, et décèle le noyau de ces organismes à l'aide d'une solution boracique de bleu polychrome. Cet organite se présente sous forme d'une granulation chromatique pleine, ou plus fréquemment sous forme d'une vésicule nucléaire, avec nucléoplasme et caryosome. La division nucléaire se fait par caryocinèse; parfois, le noyau affecte la forme d'un filament axial, parfois enfin, il se dissocie en un certain nombre de granulations, offrant l'allure et l'aspect d'un chromidium.

Un peu plus tard [38] (1907), sur trois Bactéries isolées de la Blatte, fixées au sublimé et au formol, colorées à l'hématoxyline au fer, Mencl décrit dans ces organismes un véritable noyau se divisant par un processus de mitose. L'auteur étudie minutieusement la formation des spores, précédée, en général, d'une division nucléaire et inégale. La spore unique et polaire s'empare de la plus grande partie de la chromatine libérée. L'autre partie constitue le noyau du filament restant, qui continue à vivre.

Dans une autre série de recherches, Mencl [39] répond à Guilliermond au sujet des cloisons transversales signalées par cet auteur dans *Bacillus radicosus*. Il admet que les Bactéries constituent des organismes excessivement polymorphes, puisqu'elles peuvent présenter tantôt un noyau unique, se divisant par mitose ou amitose, tantôt une spirale chromatique, parfois enfin un réticulum basophile diffus, épars dans le cytoplasme. Enfin, l'auteur (1910) décèle dans les Microcoques et les Sarcines, à l'aide de colorations vitales de bleu polychrome, au centre de la cellule, un véritable noyau entouré d'une zone hyaline.

Guilliermond [18-22], devant l'incertitude des résultats généralement obtenus, et après une série importante de recherches sur la cytologie des Cyanophycées (1905), fixant à l'alcool, au formol, au Lavdowsky, au Lenkossek, au Zenker et au Perenyi, colorant au bleu de Unna à l'hémalum et surtout au bleu de crésyl B. B. (en ce qui concerne les grains de volutine), à l'hématoxyline au fer, à la safranine et au bleu Borrel, pour ce qui a trait au système nucléaire,

cet auteur met en évidence dans les *Bacillus radicosus*, *mycoides megatherium*, des corpuscules métachromatiques, et des poches de glycogène, visibles en particulier sur les organismes végétant sur carotte et pomme de terre, où elles occupent les pôles de la cellule. Pendant les premières heures du développement, les Bactéries se colorent uniformément et sans grande différenciation. Les cloisons transversales qui précèdent la scissiparité cellulaire se forment au dépens de deux granules latéraux qui fixent avec avidité la laque ferrique, et ressemblent à s'y méprendre à des noyaux. Vers la huitième heure du développement, la cellule présente une belle structure alvéolaire, formée par un réticulum basophile, aux nœuds duquel apparaissent des grains colorables, fixant avec avidité les teintures nucléaires. La spore se forme en englobant seulement une partie de ces granulations qui servent à son édification. Quand cette spore a atteint une certaine dimension, elle s'entoure d'une membrane qui fait obstacle à la pénétration ultérieure des colorants. Tandis que les corpuscules métachromatiques non englobés demeurent dans le cytoplasme. Au point de vue systématique, Guilliermond range les Bactéries endosporées dans un groupement à part, homogène et parfaitement individualisé.

Gonder [17] (1905), étudiant *Opalinopsis* et *Chromidina*, parasites des Céphalopodes, décrit chez ces organismes un système nucléaire qui peut passer par tous les stades, depuis celui d'une masse chromatique, occupant le centre de la cellule, jusqu'à un réticulum plus ou moins pelotonné, en passant par un stade où la chromatine diffuse et fragmentée se trouve éparse dans le cytoplasme.

Calkins [5] (1905) met en évidence dans *Amœba proteus*, au premier stade du développement, un noyau unique, se divisant un grand nombre de fois, tandis que les noyaux secondaires qui ont pris naissance sont à leur tour le siège d'une véritable fragmentation, d'où l'apparition d'une phase chromidiale.

Rosc [3] à la même époque, observe chez les Trypanosomes des formes nucléaires parfaitement définies. Cependant, à un certain stade de l'évolution, il est possible de noter dans le cytoplasme des granulations issues du noyau, et représentant des chromidies émises par cet organite, qui se déleste ainsi d'une partie de sa chromatine. Ce noyau peut, lui-même, passer par toutes les formes, depuis celle d'un véritable noyau vésiculeux jusqu'à un chromidium, résultant

d'une véritable caryolyse avec dissémination des grains dans le cytoplasme.

En 1906, Perrin [45], étudiant la structure de *Tripanosoma Balbiani*, constate un noyau bien développé, sous forme d'une bande spiralee s'étendant d'un bout à l'autre de la cellule. Au moment de la division, cet organite hélicoïdal se rassemble au milieu de l'organisme, sous forme d'un filament homogène et continu, véritable tractus parcourant l'élément d'un pôle à l'autre. Cette tige nucléaire subit, à un certain stade de l'évolution, une véritable segmentation avec formation d'une soixantaine de chromosomes. Après la division cellulaire longitudinale, la formation chromidiale reprend sa structure spiralee.

Swellengrebel [55-54] (1906) étudie la cytologie de *Bacillus maximus buccalis*. Fixant au formol, colorant à la laque ferrique, ou Giemsa, ce savant met en évidence, dans la cellule, une sorte d'hélice ou de ligne brisée, à points nodaux assez fortement colorables. La division longitudinale de cet organisme s'effectue par une véritable délamination de la bande spiralee. Les deux bandes filles glissent l'une sur l'autre, puis se séparent. Les cloisons transversales délimitant deux organismes consécutifs sont très chromatiques. A certains stades, les Bacilles présentent un cytoplasme alvéolaire, sans qu'on puisse distinguer de système réticulé. Sw. conclut à un système chromidial, comparable à celui décrit dans *Fœllingeria*. Poursuivant ses recherches cytologiques, l'auteur retrouve dans certains Spirilles et Spirochètes en particulier dans *Spirillum giganteum* et *Spirochaeta Balbiani*, la même structure que dans *Bacillus maximus buccalis*, à savoir : substances nucléaires disposées en spirale et situées à la périphérie de la cellule. Le filament hélicoïdal se différencie en filament achromatique portant à ses nœuds des granulations chromatiques. Le Spirille se divise longitudinalement comme dans le Bacille isolé de la bouche. Cependant à la suite de recherches de Guilliermond, Swellengrebel abandonne son hypothèse de spirale chromatique et admet pour *Bacillus maximus buccalis* une véritable structure cytoplasmique alvéolaire, avec des granulations de chromatine disséminées dans la trame cytoplasmique. Poursuivant ses recherches, l'auteur [56] retrouve dans *Spherotilus natans*, 1908, tantôt une spirale chromatique, tantôt un corps central plus ou moins étoilé. L'auteur range cette Chlamydo-

bactériacée entre les Cyanophycées et les Bactéries proprement dites.

Plus tard, il retrouve dans *Calothrix fusca* une Cyanophycée, une structure à peu près semblable. Il met en évidence un noyau de forme primitive assez bien définie, qui se fragmente ultérieurement en grains de chromatine, lesquels se répartissent dans le cytoplasme. Swellengrebel pense que cet organisme constituerait un terme de passage entre les Cyanophycées et les Bactéries. Cependant, tous les Bacilles ne présentent pas le même aspect. C'est ainsi que l'auteur [53] décrivant *Bacterium binucleatum* met d'accord les partisans de la théorie chromidiale et ceux de la théorie nucléaire, c'est-à-dire d'un noyau morphologiquement défini. Cet organisme présente deux noyaux bien délimités et nettement distincts des grains de volutine. A certains stades, les organites nucléaires deviennent diffus et forment un filament spiralé, véritable système chromidial semblable à celui décrit par l'auteur dans les Spirilles qu'il a étudiés.

Fantham [13] 1907, dans *Piroplasma bigeminium* met en évidence la complexité de l'appareil nucléaire dans cet organisme. Quelquefois constitué par une masse unique, il est le plus souvent formé de deux masses chromatiques inégales. Fantham réserve à la plus grosse le nom de noyau, à la plus petite le nom de blépharoplaste. Il signale enfin de la chromatine diffuse donnant l'impression d'un réticulum chromidial et se demande s'il ne devrait pas y voir une distinction en idio et trophochromidies.

Zettnow [61], reprenant l'étude cytologique de *Spirillum volutans* observé par Guilliermond ne retrouve pas dans cet organisme le filament spiralé écrit par Swellengrebel, mais aperçoit une grande quantité de chromidies éparses dans le cytoplasme alvéolaire.

Rudzicka [49-50] (1903-1904-1908), dans une importante série de recherches sur la structure des Bactériacées, décrit dans *Bacillus anthracis*, après coloration à la fuschine vert de méthyle, un noyau sans membrane, en tous points comparable à celui des Métazoaires. L'auteur se sert également, dans le but d'élucider la nature de certaines granulations, de digestions gastriques qui dissolvent certains granules de nature extra-nucléaire, en sorte que cet auteur considère la cellule bactérienne comme une sorte de noyau libre dont le réseau constituerait une charpente de linine, tandis que les grains colorés

devraient être homologués à des granulations de chromatine. Continuant ses travaux, Rudzicka observe dans *Bacillus nitri* une structure alvéolaire et des grains chromatiques aux nœuds de la trame. La spore naît sous forme d'un gros grain qui ressemble à un noyau et présente les caractères de la chromatine.

Popoff [47] (1908) vérifie dans *Frontonia stylonichia* l'hypothèse de Hertwig relative à la Kernplasmarelation. Il s'élève contre ceux qui tendent à considérer la cellule sexuelle de Métazoaires comme douée de propriétés spéciales. Les phénomènes de maturation doivent s'interpréter comme des phénomènes de dépression, d'où l'émission de chromidies signalée, qui constitue un mécanisme régulateur du rapport P/K.

A la même époque Petschenko [46] décrit dans *Bacillopsis stylopigæ*, parasite de la Blatte, un noyau très net. Sa multiplication s'effectue par bourgeonnement, sans qu'on puisse voir comment s'effectue ce processus. Il est probable, que la chromatine diffuse du noyau paternel et se dirige dans le bourgeon. C'est au dépens de cette chromatine, que s'édifiera le noyau de la future jeune cellule. L'auteur décrit des formes binuclées et voit à certains stades cet organite évoluer vers un chromidium. Petschenko signale dans la cellule des corpuscules métachromatiques et pense que ce Bacille pourrait être rangé parmi les champignons.

Meyer [41] (1908), fixant au Flemming ou à l'eau bouillante, colorant à l'hématoxyline au fer, *Bacillus Pastorianus*, observe au milieu de la spore jeune, un petit granule fortement coloré, entouré d'une zone hyaline et que l'auteur considère comme un noyau. Le cytoplasme de la spore est alvéolaire. L'organite nucléaire ne saurait être confondu avec de la graisse puisque celle-ci n'existe pas, ni avec des grains de volutine, car ces granulations ne résistent pas à l'action de l'acide sulfurique étendu, tandis que les noyaux subsistent dans ce cas.

Dobbel [10], reprenant les recherches de Gonder, sur *Opalinopsis* et *Chromidina*, démontre qu'il existe dans la cellule deux sortes de granulations : les unes, véritables inclusions cytoplasmiques alimentaires, sont colorables par le rouge neutre ; les autres sont englobées dans un réticulum de plastine et sont de nature chromatinienne. On a donc affaire ici à un véritable noyau diffus. Quant au polymorphisme nucléaire décrit par Gonder, Dobbel démontre qu'il est le résultat d'une technique vicieuse.

Dans des recherches sur les Bactéries parasites du tube intestinal de crapauds, fixant au formol, colorant au Giemsa ou à la laque ferrique, Dobbel [8-9] décrit dans les cellules de *Bacillus Spirogyra* une spirale chromatique, qu'il considère comme l'équivalent d'un noyau. Ce filament se renfle à l'une de ses extrémités pour constituer l'ébauche de la spore future. Les cellules qui sporulent sont toujours plus courtes que les autres, ce qui tient à ce fait que la scissiparité cellulaire, au lieu d'être ébauchée comme dans *Bacillus Bütschlii*, est complète dans ce cas.

Dobbel (1908), reprenant ses recherches, constate dans le cytoplasme de *Bacillus flexilis*, des granulations qu'il assimile à des grains de vultine. En tout cas, il existe dans la cellule un noyau diffus incontestable. La division transversale s'effectue par une constriction médiane. La formation des spores débute par une division incomplète, tandis que les granules de chromatine augmentent de taille et s'orientent de façon à constituer une ligne spiralée, analogue à celle observée dans *Bacillus maximus buccalis*; puis la chromatine se rassemble à l'une des extrémités de la cellule pour constituer la spore. L'autre partie demeure inutilisée.

Amato [1] (1908), étudiant les Bacilles, de la pomme de terre, *subtilis*, *mycoides*, colorant vitalement au brillant Kresylblau, note pendant les premières heures du développement un noyau volumineux qui, par pulvérisation, se résout en une multitude de grains chromatiques. Ceux-ci, après condensation, fourniront la spore. L'auteur, croit voir dans *Spirillum volutans* plusieurs spores par cellule.

Dangeard [7] (1909) signale dans *Chromatium Okenii* un corps central sidérophile et safranophile, qui doit être homologué à celui décrit par Bütschli dans les Sulfobactériacées. L'auteur fait dériver ces organismes des Flagellés.

Fauré-Frémiet [14] (1909), étudiant les mitochondries des Protozoaires, constate que ces formations ne se colorent pas vitalement par le rouge neutre, et difficilement par le bleu de méthylène et l'azur. Pour cet histologiste, ces organites sont des éléments morphologiquement constants et dont l'évolution présente un certain parallélisme avec celle de l'appareil nucléaire, mais sans aucun rapport avec celui-ci. Fauré-Frémiet pense que ces granulations, qui se

colorent par les méthodes classiques des mitochondries, doivent être assimilées aux chromidies des protozoaires.

Ambroz [2] (1909), colorant au Giemsa, *Bacillus natri*, se range à l'avis de Guilliermond relativement à la structure réticulée de cette Bactérie, et à l'interprétation des granules paraissant dans les cellules jeunes au début du développement. Ces organites doivent être considérés comme l'ébauche des futures cloisons cellulaires.

Høelling [27] (1910) dans un bacille découvert, dans *Fusiformis termitidis*, colorant à la laque ferrique et au Giemsa, observe dans les cellules jeunes un noyau parfois circulaire ou ovalaire avec pôles épaissis et au centre de la cellule une zone claire. La division cellulaire s'effectue par amitose. Parfois des formes multinucléées, enfin dans les formes de dégénérescence le noyau évolue vers un système chromidial spiralé analogue à celui décrit dans les Spirilles.

Georgevitch [16] (1910) décrit la formation des spores dans *Bacillus thermophilus jivoini*, formation singulière s'effectuant à partir d'une calotte de cytoplasme polaire, et de deux granulations nées dans ce cytoplasme. Celles-ci, en se rejoignant, forment une vésicule, la préspore. Dans celle-ci apparaîtront des granulations basophiles qui constitueront les spores futures.

CHAPITRE II

BACILLUS ANTHRACIS

TECHNIQUES

Dans l'étude d'*Endomyces albicans*, nous avons insisté à maintes reprises sur la nécessité de suivre l'évolution du microorganisme et d'utiliser les méthodes de fixations et de colorations multiples, afin d'éviter les causes d'erreur qui peuvent résulter de l'emploi d'un stabilisateur unique ou d'une seule teinture basique. Cette remarque acquiert ici toute son importance, par suite de la complexité de la cellule bactérienne et de l'évolution de son appareil nucléaire.

Le choix de *Bacillus anthracis* est heureux, par suite des caractères de fixité qu'il présente; fixité dans sa morphologie, quelles que soient les causes déformantes ou inhibitrices (action des antiseptiques ou des agents physiques) qui interviennent pour modifier sa forme première; fixité dans ses caractères de virulence. Si l'on admet, par analogie, que la constitution intime du charbon présente la même stabilité que les caractères de morphologie externe sous l'influence des causes déformantes, on comprendra tout l'intérêt qui réside dans l'étude de ce microorganisme, en vue d'élucider la phylogenèse bactérienne.

L'organisme a été fixé au Perenyi et au Lavdowsky, ce dernier nous a rendu de précieux services pour la localisation des corpuscules métachromatiques, après emploi du bleu polychrome, et différenciation à la Glycérinæthermischung, nous nous sommes également servi, avec succès, du fixateur suivant, ce qui nous a permis d'abréger la durée des fixations dans un certain nombre de cas :

Alcool à 95°	300 gr.
Sublimé	5 gr.
Acide acétique	5 gr.

Les colorations ont été effectuées à l'hématoxyline au fer, l'hématéine alunée acide; le violet de gentiane, le bleu polychrome, la safranine, suivant les méthodes qui ont été indiquées pour le muguet.

Les préparations ont été montées au Baume du Canada.

EVOLUTION

L'évolution du microorganisme a été suivie à la 6^e h., 8^e h., 12^e h., 19^e h., 24^e h., 36^e h., 48^e h., 66^e h., 72^e h., 84^e h., ce qui correspond à six stades dans le Cycle évolutif.

1 ^{er} stade : Indifférenciation cellulaire.....	6 h.
2 ^e stade : Noyau vésiculeux	8 h.-12 h.
3 ^e stade : Noyau plein.	19 h.-24 h.
4 ^e stade : Noyau diffus	36 h.-48 h.
5 ^e stade : Sporogenèse	66 h.-78 h.
6 ^e stade : Spore.....	84 h.

1^{er} Stade. — Indifférenciation

Seuls, l'hématoxyline au fer et le bleu polychrome permettent de déceler une structure, encore faut-il que les régressions soient très poussées. Il est possible en effet de rencontrer quelques corpuscules métachromatiques; ceux-ci, en petit nombre et de taille très réduite, apparaissent dans les organismes en voie de germination. Il semblerait qu'à ce stade, tous les matériaux nutritifs concourent à l'édification du cytoplasme, par suite de la prolifération abondante de la Bactérie. La laque ferrique, sur des préparations excessivement régressées, permet d'observer de fines traînées granuleuses, sidérophiles qui se présentent en amas plus ou moins irréguliers et qui constituent, sans doute, l'ébauche des noyaux futurs. L'hématéine et le violet de gentiane, que nous aurions voulu employer pour affermir cette hypothèse, ne donnent que des résultats défectueux, par suite de la densité cytoplasmique et de sa basophilie accentuée à ce stade. Pour expliquer les difficultés d'observation du contenu cellulaire dans les éléments très jeunes, il nous paraît difficile d'admettre un état spécial de la membrane, s'opposant à la pénétration des colorants. On comprendrait, sans doute, que cette teinture s'effectue difficilement chez les spores aux membranes fortement cutinisées.

mais ce n'est pas le cas ici. La densité du cytoplasme et peut-être même une véritable imbibition de ce cytoplasme par de la nucléine diffusée et non encore différenciée, permettrait d'expliquer l'uniformité et l'homogénéité du contenu bactérien, chez des éléments très jeunes.

2^{me} Stade. — Noyau vésiculeux

Au stade précédent, succède rapidement un nouvel état de la cellule. Les masses granuleuses plus ou moins éparses dans le cytoplasme s'orientent au centre de l'élément de façon à constituer une espèce de morula basophile subovoïde, qui ne tarde pas elle-même à se vacuoliser et à aboutir à un véritable noyau vésiculeux, en tous points comparable à celui des cellules somatiques végétales ou animales : à savoir noyau vésiculeux avec nucléohyaloplasma et réseau chromatique sculpté à la surface de la vésicule.

Parfois un seul de ces organites par élément. Parfois les cellules sont multinucléées, aspect qui est surtout visible dans les bâtonnets libres, issus de la dissociation des chapelets bactériens. Souvent aussi, le noyau est représenté par une petite vésicule ovoïde renforcée aux extrémités et occupant l'un des pôles du bâtonnet, tantôt enfin, ce noyau comporte un caryoplasme avec un caryosome et sans doute aussi une membrane nucléaire. Pendant cette phase de son évolution, le noyau présente quelque analogie, au point de vue morphologique, avec celui que nous décrirons ultérieurement dans *Bacillus mycoïdes*.

5^{me} Stade. — Noyau plein

Mais l'état vésiculeux du noyau est transitoire, les filaments ou bâtonnets chromatiques de cet organite se multiplient, si bien que par accumulation et condensation consécutive de la chromatine, la vésicule nucléaire primitive, se trouve remplacée par une sphérule pleine, dépourvue de structure, fixant avec avidité et sans exception tous les colorants nucléaires : violet de gentiane, hématéine, hématoxyline ferrique, safranine, bleu de Unna, aspects mis en évidence, avec une netteté toute particulière après les fixations au Perenyi. Nous avons dit qu'à ce stade le noyau était dépourvu de structure et qu'il se présentait comme une sphérule homogène et dense; si

l'on pousse en effet les régressions, le noyau apparaît comme un petit disque sombre, limité à la périphérie par un fin liseré plus coloré. Ainsi donc, à un noyau originel plus ou moins diffus, représentant le premier stade d'une nucléose très rudimentaire chez des individus jeunes, issus du développement de la spore, succède un noyau vésiculeux qui, par accumulation et condensation de sa chromatine, se transforme en un noyau circulaire et dense. Cet organite peut être morphologiquement comparé au noyau plein et non différencié, qui constitue la tête du spermatozoïde. Ce troisième stade correspond au maximum du développement cultural. Il semble en effet que ce noyau, véritable noyau végétatif ou trophonucleus, préside à la multiplication cellulaire et aux phénomènes d'assimilation active, comme on le verra par la suite. Cet organite nucléaire se divise d'une façon assez spéciale, division qui est mise en évidence avec netteté sur les éléments très regressés après coloration à l'hématoxyline ferrique. Au milieu du noyau, apparaît en effet une cloison, tantôt parallèle, tantôt perpendiculaire au grand axe du bâtonnet. Cette cloison se délamine et les deux moitiés nucléaires se séparent l'une de l'autre, puis s'arrondissent, s'individualisent, les deux noyaux fils sont désormais constitués.

La division cellulaire consécutive peut s'effectuer différemment, suivant la position qu'occupe le noyau paternel dans l'élément. Quand cet organite est au centre de la cellule bactérienne, les noyaux fils issus de la mitose sont aussi voisins que possible puisqu'ils ne sont séparés l'un de l'autre que par le court espace qui délimite les cellules-filles (position proximale). Si au contraire, le noyau paternel occupe l'un des pôles de l'élément, la division donnera naissance à deux noyaux qui vont s'éloigner rapidement, l'un demeurant à l'emplacement du noyau paternel, c'est-à-dire conservant sa situation polaire, tandis que l'autre se dirigera à l'autre pôle de la cellule (position distale), si bien que dans ce cas la bactérie mère constitue un véritable article pourvu de deux noyaux polaires; c'est à ce moment que survient la division cellulaire. Fréquemment aussi, ce noyau ambulateur s'arrête dans son trajet et demeure sensiblement au milieu de l'élément; à ce moment alors, survient la scissiparité qui donnera naissance aux cellules filles (Position nucléaire médiane). Ces anomalies dans la division

nucléaire permettent de comprendre la disposition des noyaux dans les files multi-cellulaires de bâtonnets bactériens.

Parfois aussi, le signal de la scissiparité protoplasmique est donné par une espèce de petit bâtonnet transversal, médian, sensiblement perpendiculaire au grand axe de la bactérie, clavulaire et sidérophile (mais au point de vue chromatique, sidérophile seulement) et qui constitue le signal précurseur, l'ébauche de la future cloison; celle-ci, en tous cas, chromatiquement et morphologiquement, est indépendante du noyau, admirablement individualisé.

A ce stade correspond également une sécrétion de corpuscules métachromatiques, ce qui confirme nos précédentes observations, et démontre que les grains de volutine paraissent coïncider avec une hyperactivité cellulaire. Cette accumulation de métachromatine dans la cellule bactérienne constitue une réserve transitoire, appelée à disparaître ultérieurement, quand les conditions végétales deviendront moins favorables ou que la cellule poursuivant son évolution, élabore ses organites de conservation : les spores.

Dans les éléments où le noyau affecte une forme globuleuse, pleine et indifférenciée, le cytoplasme se creuse d'alvéoles séparées les unes des autres par des tractus parallèles qui, dans leur ensemble, sont perpendiculaires au grand axe du bâtonnet cellulaire, disposition scalariforme assez fréquente et mise en évidence, avec netteté sur des préparations fixées au Perenyi et colorées au bleu de Unna. Cette structure est particulièrement nette dans les cellules isolées. Il n'est pas rare, non plus, de rencontrer dans certains éléments une vacuole unique, ellipsoïde, creusée dans le cytoplasme, disposition qui est fréquente dans les files de bâtonnets bactériens.

4^{me} Stade. — Noyau diffus

La cellule ne tarde pas à subir une importante modification qui intéresse autant sa morphologie externe, que sa structure intime. Si l'on examine en effet, une culture de 36 heures, on s'aperçoit qu'à côté des formes signalées précédemment, il existe, en très grand nombre, des éléments libres (non plus disposés en file), et à contours irréguliers, comme si les cellules étaient constituées par un agglomérat de sphérules élémentaires plus ou moins irrégulièrement groupées. Cet aspect bulleux et boursoufflé des cellules pourrait être rapproché

de ces formes que l'on signale chez les bactéries âgées en voie de dégénérescence ou placées dans des conditions dysgénésiques. L'étude cytologique du contenu cellulaire va nous permettre d'expliquer l'existence de ces formes d'involution transitoire de l'élément bactérien.

L'aspect boursoufflé de la cellule peut provenir de la modification importante survenue dans la morphologie du noyau. La structure intime de la cellule, à ce stade, est tellement modifiée, qu'il semblerait, de prime abord, que l'on se trouve en présence d'une impureté bactérienne, venue contaminer le milieu. Mais une observation attentive et répétée permet d'éclaircir cette structure. Le noyau, en effet, se trouve constitué non plus par un ellipsoïde ou une sphérule dense, mais par un véritable réseau ou filet chromidial, parcourant tout l'élément au détriment du cytoplasme qui disparaît presque complètement, puisqu'il ne se trouve plus représenté que par un mince revêtement périphérique, acidophile, se moulant sur le réticulum nucléaire basophile. Le cytoplasme est parfois tellement réduit, qu'il peut être difficile de le délimiter avec précision; on y parvient cependant par des colorations à l'éosine énergiquement poussées. Il est alors possible de le mettre en évidence, sous forme de petites calottes polaires, coiffant les extrémités des bâtonnets. On n'a donc pas affaire ici à un noyau pur, puisque le protoplasme existe quoique considérablement réduit, observation qui nous permet de nous élever, avec véhémence, contre l'hypothèse qui consiste à assimiler la cellule bactérienne à un archiplasme, à une sorte de noyau ambulant, dont le réseau cytoplasmique constituerait le peloton chromatique formé de plastine, tandis que les granules seraient constituées de chromatine (théorie de Rudzicka).

Mais entre ces deux formes nucléaires (noyau vrai et réticulum chromatique) existe-t-il des formes de passage ou a-t-on affaire, par un saut brusque et sans transition, à une transformation du noyau en réticulum. Par une observation minutieuse et en se servant des indications fournies par des teintures nucléaires différentes, il est facile de noter tous les stades compris entre le trophonucleus et le réseau chromatique diffus, qui assure les fonctions du noyau disparu. Le trophonucleus est, en effet, le siège d'une véritable caryolyse qui s'effectue de la périphérie vers le centre, en sorte qu'il diminue rapidement de masse (dissolution centripète), cependant que la chroma-

tine diffusée se fixe comme une laque sur les tractus du cytoplasme.

Ainsi donc, à côté de cellules bactériennes à corps cylindriques et bien délimités, pourvues d'un noyau parfaitement défini (trophonucleus), il existe des éléments possédant un organite nucléaire plus petit, en voie de caryolyse, lequel donne naissance à un réticulum basophile, véritable chromidium, admirablement individualisé, au sein d'un cytoplasme bulleux et très réduit. Ce processus caryolytique permet maintenant de comprendre l'évolution nucléaire des premiers stades et la nécessité du passage du noyau vésiculeux vers le trophonucleus, celui-ci, à son tour, homogène et dense, constituant l'intermédiaire entre la vésicule et le réticulum basophile. On s'expliquerait difficilement, en effet, le processus de fonte du noyau vésiculeux dont la chromatine se trouverait inégalement répartie sur les différents points de sa surface. L'atrophie du trophonucleus, véritable dégénérescence nucléaire, transitoire, permet enfin d'expliquer les formes boursoufflées des cellules qui se trouvent momentanément placées dans des conditions intrinsèques défectueuses, consécutivement à une rénovation de leur contenu, à la suite d'un bouleversement qui intéresse à la fois cytoplasme et noyau. Les grains de volutine sont très rares, cette absence de corpuscules métachromatiques dans les formes bulleuses est un argument en faveur de ce fait, que la cellule se trouve dans des conditions peu favorables pour accumuler des réserves, puisque de par ses caractères morphologiques, elle paraît en voie de dégénérescence.

b) Cet aspect bulleux des éléments ne demeure pas ainsi jusqu'à la fin de l'évolution bactérienne; déjà, à la 48^e heure, la cellule a repris sa morphologie externe primitive, et se présente à l'état dissocié sous la forme de bâtonnets cylindriques aux extrémités arrondies. Le reticulum a également subi une modification, au lieu d'être constitué par un assemblage de cerceaux chromatiques, il affecte davantage la forme d'une ligne brisée plus ou moins irrégulière, où se trouve représenté par une série de tractus claviculaires, perpendiculaires au grand axe du bâtonnet cellulaire, et par suite parallèles entre eux. Il semblerait que la substance nucléaire à l'origine régulièrement répartie sur des circonférences chromatiques se rassemble aux extrémités des tractus, d'où leur aspect claviculaire, ou bien se condense aux nœuds du réseau. Pas plus que précédemment, le cytoplasme n'est abondant à ce stade et il se trouve formé par une mince couche péri-

phérique, entourant le réticulum et la vacuole centrale. Quant aux corpuscules métachromatiques, ils sont nombreux et volumineux. La cellule qui a repris son aspect normal est le siège d'une hyperactivité fonctionnelle; elle accumule des réserves de métachromatine dans son cytoplasme en vue de la sporogénèse. Cette accumulation de grains de volutine dans la cellule est à rapprocher de ce fait, que chez un grand nombre de champignons et d'Ascomycètes en particulier, l'apparition des corpuscules métachromatiques précède la formation des spores.

5^{me} Stade. — Stade sporogénèse.

De la 60^e à la 72^e heure l'aspect morphologique change. Le noyau évolue vers la spore, tandis que la cellule va tendre vers le sporange. La formation nucléaire, après avoir occupé dans la cellule une surface considérable puisqu'elle s'étendait comme un réseau au point de faire disparaître presque complètement la cytoplasmie, va subir une régression morphologique et aboutir à la forme du nucleus primitif homogène et dense. A cet effet, les tractus chromatiques, dont l'ensemble constituait l'idiochromidium, seront le siège d'une différenciation moniliforme; les grains de chromatine vont glisser le long des trabécules cytoplasmiques et se rassembler à la périphérie du microorganisme. Cette régression granuleuse trabéculaire débute par les travées qui barrent la cellule transversalement; si bien qu'à ce stade la cellule se trouve traversée longitudinalement par deux bandes chromatiques plus ou moins granuleuses. Celles-ci se rétractent à leur tour par une sorte d'amiboïsme et se dirigent vers les pôles de l'élément où elles forment deux amas muriformes qui ne tardent pas à devenir ellipsoïdaux, puis à se concréter totalement en devenant sphériques, affectant, à cet état, la morphologie et la chromatocité des noyaux homogènes de la première heure. Quand la cellule est munie d'une seule vacuole, les granules chromatiques se rassemblent tous en un même point de la cellule et la bactérie ne possède plus qu'une seule présore et devient un monosporange lorsque la présore est devenue spore.

Chez ces organismes en voie de sporulation, les corpuscules métachromatiques disparaissent par suite du ralentissement des processus vitaux, cependant que la chromatine fixe avec intensité les

colorants basiques; les bacilles végétatifs s'effacent en effet, pour peu que les régressions soient poussées, tandis que les éléments en voie de sporulation subsistent seuls, observation qui est parfaitement en accord avec ce que nous savons aujourd'hui, sur la basophilie des noyaux reproducteurs.

Ainsi donc, pendant la période purement végétative, le noyau est bien caractérisé, dense et homogène. Cet organite préside aux phénomènes de division active de la Bactérie, à son expansion dans l'espace, il constitue donc un véritable trophonucleus. Son rôle sous cette forme s'arrête là. Pour que la Bactérie puisse poursuivre son évolution dans le temps, une nouvelle formation apparaît, issue du noyau lui-même qui entre en caryolyse, c'est le réticulum basophile diffus qui représente un système idiochromidial duquel naîtra la spore.

6^{me} Stade. — Spores

Le contenu des sphérules et des ellipsoïdes chromatiques qui constituent la présore s'estompe, par suite d'une diminution des affinités chromatiques pour les colorants nucléaires. La partie centrale n'est plus représentée que par une plage faiblement teintée, limitée par un liseré périphérique plus net, renforcé aux extrémités ou parfois plus ou moins finement ponctué, formant ainsi une couronne de granulations ou une sorte de feston circulaire faisant saillie dans le cytoplasme. A ce stade, les corpuscules métachromatiques ont entièrement disparu; la cytolyse protoplasmique intervient qui libère les spores du contenu cellulaire, en sorte qu'elles vont se trouver libres dans le milieu ambiant.

CHAPITRE III

BACILLUS MEGATHERIUM

TECHNIQUE

Nous nous sommes servi pour effectuer la fixation de cet organisme du liquide de Perenyi, qui nous a donné d'admirables fixations nucléaires, et du Lavdowsky qui s'est montré un stabilisateur parfait des corpuscules métachromatiques. Nous avons employé comme colorant, l'hématoxyline au fer et l'hématéine alunée acide; comme couleur basique d'aniline : le bleu polychrome, la safranine et le violet de gentiane. Cette dernière s'est montrée admirable pour l'étude du réticulum basophile diffus. Notre but, en employant plusieurs colorants basiques différents, est motivé par ce fait que le noyau des Bactériacées paraît être de structure excessivement simple, puisqu'il se présente sous forme d'un petit corpuscule plein, homogène et dense. L'impossibilité dans laquelle on se trouve de définir cet organisme morphologiquement, oblige donc l'observateur à le définir chromatiquement. La nécessité des colorations nucléaires multiples est impérieuse, indispensable, puisqu'elle permet de caractériser dans la cellule aux différents stades de son évolution : des corpuscules métachromatiques, un noyau permanent, une formation basophile diffuse. Le tableau suivant résume d'ailleurs les indications chromophiles de cette triple formation cytoplasmique.

L'examen de ce tableau donne donc raison à la méthode que nous préconisons et démontre l'utilité des nombreuses colorations nucléaires puisqu'elles ne donnent pas toutes les mêmes indications.

Les cultures ont été effectuées sur gélose saccharosée, à la température de 23°.

	NOYAU		CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES		RÉTICULUM BASOPHILE DIFFUS	
	LAVDOWSKY	PERENYI	LAVDOWSKY	PERENYI	LAVDOWSKY	PERENYI
Hématoxyline. .	Coloré	Coloré	Rarement colorés	0	Coloré	Coloré
Hématéine . . .	Coloré	Coloré	Colorés	0	0	0
Violet de gentiane. .	Coloré	Coloré	Colorés	0	Faiblement coloré	Admirable- ment coloré
Safranine. . . .	Coloré	Coloré	Colorés	0	Faiblement coloré	Bien coloré
Bleu polychrome . .	Coloré	Coloré	Colorés	0	0	Bien coloré

Nous distinguons cinq stades dans l'évolution du microorganisme :

EVOLUTION

1^{er} stade. — Indifférenciation cellulaire.

2^e stade. — Nucléose et formation basophile condensée.

3^e stade. — Nucléose et formation basophile diffuse.

4^e stade. — Sporogenèse.

5^e stade. — Spore.

1^{er} Stade. — Indifférenciation cellulaire.

Dans les organismes jeunes, issus du développement de la spore, la bactérie se présente sous forme d'un bâtonnet plein, dense, basophile et dans lequel il est impossible de reconnaître une structure différenciée. Pas de vacuole visible, pas de formations nucléaires ni basophiles accessoires, seuls les corpuscules métachromatiques en abondance se présentant sous forme de grosses granulations au nombre de 3 ou 4 et dont les plus volumineuses occupent les pôles de la cellule. Dans quelques éléments, une vacuole unique et sphéroïde apparaît, mais alors les corpuscules métachromatiques disparaissent par une sorte de fusion centripète. On ne les retrouve plus dans les organismes munis d'un système vacuolaire longitudinal, constitué par une longue vacuole entrecoupée par des ponts de protoplasme.

2^e Stade. — Nucléose et formation basophile condensée

a) A ce stade le cytoplasme se trouve creusé d'une vacuole sphéroïde qui s'allonge peu à peu et finit par occuper presque toute la longueur de l'élément, en sorte que, dans les cellules adultes, cette formation n'offre plus qu'un mince revêtement pariétal, renforcé en calotte aux extrémités. La vacuole centrale ne reste pas indivise et se trouve entrecoupée par un système de trabécules transversaux issus du protoplasme, ce qui donne à l'ensemble de cette formation un aspect alvéolaire, scalariforme, très net.

b) Les corpuscules métachromatiques de ce stade sont rares, quand ils existent; on les retrouve sous forme de fines granulations dans les bâtonnets pourvus d'une vacuole unique et sphéroïde. Ils disparaissent entièrement, quand la cellule arrive à l'état adulte et que le cytoplasme est devenu alvéolaire.

c) Tous les colorants nucléaires mettent en évidence le noyau avec une netteté indiscutable. Il se présente sous forme d'un petit corpuscule plein, dans lequel il n'est pas possible de définir une structure particulière, vu la ténuité de cet organite. Unique en général, il est situé à l'une des extrémités du bacille dans la calotte cytoplasmique polaire. Il n'est pas rare, cependant, de rencontrer des éléments binucléés dans lesquels chacun des pôles du bâtonnet est occupé par un noyau; enfin, mais plus rarement, des éléments multinucléés, véritables articles à 3 ou 4 noyaux qui subissent une rapide fragmentation scissipare aboutissant à la mise en liberté de tronçons uninucléés. La division nucléaire, lorsque nous avons pu l'observer, paraît se faire par un simple étirement, c'est donc une division amitotique. Nous n'avons jamais pu assister à un processus caryocinétique. En ce qui concerne la division nucléaire et la position des noyaux dans la cellule-mère, trois cas peuvent se présenter :

1^o La position du noyau est polaire, le noyau fils s'éloigne du noyau paternel et se dirige dans la calotte cytoplasmique opposée (position distale); survient la division cellulaire qui sépare en deux tronçons cet article binucléé bipolaire.

2^o Parfois ce noyau ambulateur s'arrête dans son trajet au milieu de l'élément (position médiane), une fragmentation scissipare divisera cette bactérie en deux bâtonnets, pourvus chacun d'un seul organite nucléaire présentant la même situation dans leur cellule respective que dans la cellule mère.

3° Dans un troisième cas le noyau paternel occupe une situation médiane auquel cas le bâtonnet est pourvu de deux vacuoles polaires, l'amitose décomposera le noyau paternel en deux noyaux fils qui seront après la division cellulaire aussi voisins que possible l'un de l'autre (position proximale).

Ces remarques permettent de comprendre la position qu'occupent les noyaux dans les files de bâtonnets bactériens où l'on peut noter simultanément les trois aspects que nous avons indiqués avec détail ci-dessus.

Pour conclure, nous dirons que nous avons bien affaire ici à un noyau, puisque cet organite présente tous les caractères chromatiques des noyaux, puisqu'il est défini par une petite masse sphéroïde qui se divise amitotiquement, puisqu'il est un, dans les fixation et coloration au Perenyi-hématéine et qu'il se rencontre alors dans la cellule à l'exclusion de toute autre formation cytoplasmique. C'est un noyau non plus transitoire, mais permanent et visible, pendant toute la durée de l'évolution. Il n'est donc pas possible de le confondre avec une de ces granulations plus volumineuse de la formation basophile qui n'est perceptible avec netteté qu'après certaines fixation et coloration (Perenyi et violet de gentiane).

Nous dirons d'autre part, que ce noyau n'est pas un grain sporogène. A ce stade, en effet, ces derniers organites ne sont jamais le siège de division amitotique et ne se présentent pas avec les mêmes caractères morphologiques. Ce qui donne de la force à cette conception, c'est que le noyau de *Bacillus megatherium* présente la même structure et les mêmes caractères de position au moment de la scissiparité que l'organite nucléaire, admirablement défini, volumineux, dense et transitoire de *Bacillus anthracis*.

Le noyau de *Bacillus megatherium* n'est pas un grain sporogène, puisqu'il assure les fonctions physiologiques de la cellule jeune ; fonctions de nutrition et de division dans l'espace. Ce n'est pas un grain sporogène, mais il tend ultérieurement vers cette formation quand les phénomènes de division active se ralentissent. Si l'on admettait cependant que le noyau n'existait pas réellement, il faudrait supposer ou bien que le grain sporogène assume les fonctions nucléaires dans des cellules jeunes, ce qui serait en désaccord avec nos conceptions actuelles sur la physiologie des spores en voie de formation ; ou bien admettre que ce grain

constitue une spore jeune en voie de croissance sans aucun attribut nucléaire et que ces attributs soient remplis par la formation basophile, ce qui ne saurait être, puisque cette formation ne se colore qu'imparfaitement et incomplètement par les colorants nucléaires dont nous avons fait usage. Cette hypothèse est donc à rejeter.

Il y a dans les cellules de *Bacillus megatherium* à ce stade de très rares corpuscules métachromatiques, un véritable noyau jouant le rôle de trophonucleus et une formation basophile complètement indépendante de cet organe.

L'étude de la formation basophile est particulièrement intéressante, car elle se rapproche de celle décrite par nous dans le Muguet. Dans les cellules fixées au Perenyi, puis colorées au violet de gentiane, on observe à côté du noyau un peu plus volumineux, des grains parfois épars dans le cytoplasme, mais souvent aussi, agglomérés en grappes ou en tétrades. Ces amas ne tardent pas à s'épanouir et à se dissocier par groupes de deux. Les couples ainsi libérés vont se séparer à leur tour, tandis que les deux granulations constitutantes s'éloignent, tout en restant réunies l'une à l'autre par un fin tractus. Quelle est la nature de ces granulations? La difficulté des recherches micro-chimiques, l'incertitude de ses résultats, appliqués à l'étude des microorganismes ne peut donner que des résultats peu intéressants. Ces granulations basophiles ne sont pas des grains de volutine, puisqu'ils ne possèdent aucun des caractères de la métachromatine, vis-à-vis des colorants basiques. Elles ne sont pas, d'autre part, de nature chromatinienne, puisque l'hématéine, ce colorant nucléaire le plus électif, ne les met pas en évidence. Au point de vue physiologique, nous ferons remarquer que dans les éléments jeunes et à protoplasme dense, l'observation ne permet que de déceler des corpuscules métachromatiques, mais jamais de grains basophiles ni de noyaux. On pourrait à la rigueur admettre que la densité du cytoplasme masque le contenu intracellulaire qui peut renfermer : le noyau et les grains basophiles à l'état figuré, ou bien, le noyau à l'état dissous, en solution plus ou moins intime avec le protoplasme où il se trouve par suite, sous forme latente, à côté des grains basophiles également en état de dissolution. On pourrait enfin supposer que le noyau est à l'état figuré, qu'il est représenté par une granulation que la densité du cytoplasme ne permet pas d'observer et que les grains basophiles n'existent pas à ce stade. Entre ces trois

hypothèses, il est difficile de répondre catégoriquement. Cependant, d'après ce que nous savons sur la suite du développement, nous accordons la préférence à la dernière hypothèse. Le noyau, en effet, se retrouve dans la spore, il y a donc quelque chance pour qu'il existe également sous une forme figurée, dans les Bactéries jeunes issues de la germination de cette spore. Quant aux grains basophiles, s'ils existent en puissance de dissolution dans le cytoplasme, ils pourront se concréter par la suite sous forme de granulations, en amas plus ou moins volumineux. Mais il se pourrait également qu'ils apparaissent dans la cellule, consécutivement à la fonte des corpuscules métachromatiques et à la vacuolisation du cytoplasme qui se décharge ainsi d'une partie de sa substance. Les produits issus de ces deux formations pourraient servir par suite à l'élaboration du réticulum basophile. Cette formation paraît être en rapport avec l'activité cellulaire et pourrait être assimilé à une formation ergastoplasmique ou peut-être mitochondriale; hypothèse qui est assez en accord avec les faits observés par nous à savoir :

1° Que le Perenyi, fixateur chromique, est doué d'un pouvoir oxydant net, puisqu'il décompose l'iodure de potassium et peut agir, par suite, comme réactif de chromisation;

2° Que le violet de gentiane colore admirablement ces granulations après fixation au Perenyi (propriété des formations mitochondriales).

3° Que l'hématoxyline ferrique les teinte également, mais avec moins de netteté que la précédente solution (propriété commune à l'ergastoplasme et aux mitochondries).

3^{me} Stade. — Nucléose et formation basophile diffuse

Il n'existe pas de corpuscules métachromatiques à ce stade. Ils ont entièrement disparu. Le cytoplasme se présente avec les mêmes caractères morphologiques qu'au stade précédent, c'est-à-dire qu'il affecte une structure alvéolaire, creusée d'une longue vacuole longitudinale entrecoupée de travées cytoplasmiques transversales. Le noyau offre également les mêmes caractères structuraux; il a l'aspect d'un granule homogène et dense prenant avec avidité et sans exception tous les colorants nucléaires et se divisant par amitose. Sa position dans la cellule est presque toujours polaire, il

est très rare de rencontrer un noyau central avec, de chaque côté, un système alvéolaire.

Seule, la formation basophile diffère, les amas granuleux qui la constituent, subissent un véritable épanouissement et se dissocient par groupes de deux granulations. Les couples ainsi libérés vont se séparer à leur tour, tandis que les deux grains de chaque couple s'éloignent tout en restant réunis l'un à l'autre par un fin tractus. Ces travées s'orientent, en sorte que finalement, la cellule se trouve barrée transversalement par un système de trabécules claviculaires, perpendiculaires au grand axe du bâtonnet cellulaire, et par suite sensiblement parallèles, entre eux. On n'observe plus guère que cet état scalariforme à la 62^e heure du développement. La basophilie de ces grains, très accusée pour le violet de gentiane, est moins nette pour la laque ferrique et la safranine, elle est nulle pour l'hématéine.

4^{me} Stade. — Sporogénèse

Les caractères du noyau se modifient peu à peu, sinon chromatiquement, tout au moins morphologiquement. Il augmente de volume et finit par occuper toute la calotte cytoplasmique de l'extrémité bacillaire. Il se présente alors, sous forme d'une granulation circulaire ou ovoïde, homogène, dense, volumineuse, présentant les mêmes affinités que le noyau pour les colorants basiques. Cet organite issu du noyau lui-même qui a subi une sorte de gonflement, constitue le grain sporogène. Il diffère du noyau par sa taille plus volumineuse, il en diffère encore par ce fait qu'il ne se divise pas. Ce grain sporogène possède donc des attributions nouvelles, il ne préside plus comme le trophonucléus aux phénomènes de division et d'assimilation actives, il a pour fonction d'élaborer la spore. Cet organite qui présente encore la chromatécité des noyaux peut être assimilé à un véritable idionucléus qui a pour mission de préparer la reproduction dans le temps.

Ainsi donc, à ce stade, la cellule demeure une et indivise, elle va utiliser son cytoplasme et sa formation basophile en vue de l'élaboration définitive des spores.

5^{me} Stade. — Spore

Le grain sporogène s'allonge, devient ovoïde et finit par occuper à moitié de la longueur bacillaire. Ses affinités chromatiques vis-à-vis

des colorants nucléaires décroissent, cependant que la chromatine paraît se concréter au centre de l'ellipsoïde sous forme d'une granulation sensiblement de même taille que les noyaux primitifs et qui représente sans doute le noyau des futurs bâtonnets issus de la germination des spores (2^e stade, formation basophile condensée et nucléose).

A un stade plus avancé, la périphérie de l'ellipsoïde se cutinise. Aucune granulation n'est plus perceptible à l'intérieur de cette formation; la spore actuelle est désormais constituée. Pendant cet accroissement endogène, une partie des granulations basophiles se trouve englobée par la spore, l'autre partie constitue un épiplasma inutilisé, qui entre rapidement en dégénérescence, ainsi que l'attestent les colorations au violet de gentiane et à l'hématoxyline ferrique. Les travées claviculaires constituantes s'effacent et ne se présentent plus que sous forme de bâtonnets achromatiques colorables, comme le cytoplasme. Cet épiplasma subit une dissolution complète, tandis que la spore se détache et devient libre dans le milieu ambiant. Nous voyons donc, que dans *Bacillus megatherium*, la spore ne provient pas du réticulum basophile ou de granulations plus ou moins volumineuses faisant partie de ce réticulum, la spore est issue du noyau lui-même en passant par l'intermédiaire du grain sporogène.

Bacillus megatherium possède les trois formations cytoplasmiques décrites par nous dans le Muguet, à savoir : noyau, corpuscules métachromatiques, formation basophile. De ce que le réticulum basophile de *Bacillus megatherium* ne possède pas les mêmes affinités que celui d'*Endomyces*, il n'y a pas lieu de conclure nécessairement à une divergence dans leurs attributs physiologiques. Ce réticulum est très probablement chez ces deux organismes de nature ergastoplasmique ou mitochondriale.

Enfin, nous nous garderons de généraliser et de dire que la caractéristique des Bactéries endosporées est de posséder un noyau. Des recherches entreprises par nous sur *Bacillus mycoides* et *Bacillus anthracis* nous autorisent à penser qu'à côté d'un réticulum basophile diffus pouvant assumer les fonctions d'un noyau, qu'à côté de corpuscules métachromatiques de nature extranucléaire, il existe aussi un organite nucléaire transitoire et bien défini.

CHAPITRE III

BACILLUS MYCOIDES

Cet organisme a été fixé et coloré par les mêmes méthodes que celles qui nous ont servi dans l'étude de *Bacillus anthracis* et de *Bacillus megatherium*. Nos recherches n'ont porté que sur les formes jeunes de *Bacillus mycoides*. Nous voulions, en effet, mettre en évidence dans cet organisme, pendant les premières heures du développement, les noyaux transitoires décrits par certains observateurs dans ce Bacille. Guilliermond, qui a observé de très près l'évolution de cette Bactérie, a pu déceler un réticulum chromatique sous forme d'une trame d'allure et de forme très caractéristiques, mais il paraît avoir laissé échapper dans un certain nombre d'éléments, pendant le premier stade du développement, des petits grains (un par élément) prenant les colorants nucléaires, avec avidité la laque ferrique et qui pourraient être, selon nous, assimilés à des noyaux. La position de ces granules nucléaires est très variable. Tantôt ils occupent les pôles de l'élément, tantôt ils se trouvent en rapport intime avec le réticulum chromatique médian véritable, corps central assimilable à celui décrit par Bütschli dans les Sulfo-Bactéries. Quand l'organite nucléaire occupe une position polaire, il se trouve alors nettement individualisé et parfaitement indépendant du corps central. Ce qui rend l'étude de ce grain particulièrement délicate, c'est qu'il présente sensiblement les mêmes affinités vis-à-vis des colorants nucléaires que le réticulum basophile; lorsque ce grain est en rapport avec le réticulum, on pourrait objecter que cet organite est insuffisamment caractérisé, imparfaitement individualisé, et qu'il peut provenir du réseau basophile lui-même dont certains granules plus volumineux résisteraient davantage à la décoloration et seraient par suite visibles même lorsque les tractus qui constituent la trame

ont disparu. Il n'est pas possible de triompher de l'argument d'une façon indubitable. Les colorants nucléaires employés : violet de gentiane, bleu polychrome et surtout l'hématéine donnent des résultats moins nets que l'hématoxyline au fer. Mais la théorie du noyau transitoire reprend toute sa valeur lorsque le point nucléaire occupe l'un des pôles de l'élément opposé à la formation basophile. Dans ce cas il est parfaitement indépendant du système chromatique central avec lequel il ne peut être confondu, puisqu'il se trouve séparé de cette vésicule par une bande plus ou moins large de protoplasme.

Ainsi donc, certaines cellules présentent à ce stade un grain nucléaire et un système basophile, véritable corps central formé par un assemblage de tractus chromatiques, claviculaires, tantôt spiralés, tantôt placés parallèlement entre eux, parfois enfin, offrant une structure radiée. L'allure de ce réseau présente en quelque sorte l'aspect d'un noyau vésiculeux; il se divise amitotiquement par étirement. Enfin, dans un certain nombre de microorganismes, on aperçoit, surtout après la fixation et coloration au Lavdowsky, bleu polychrome, des corpuscules métachromatiques, généralement très abondants dans les cellules et paraissant surtout disposés dans le cytoplasme; ils sont plus rarement visibles dans le système nucléaire central. Nous n'avons pas jugé utile de terminer le développement complet du microorganisme, cette étude ayant été poussée très à fond par Guilliermond.

Bacillus mycoides présente par conséquent à la 12^e et 24^e heure de son développement un petit grain nucléaire transitoire concurremment avec un réticulum basophile et des corpuscules métachromatiques.

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS

Les recherches que nous avons entreprises sur la cytologie des Bactériacées jointes aux observations publiées par un certain nombre de cytologistes, nous permettent de penser que le polymorphisme structural de ces microorganismes n'en est pas un. En dehors des Bactéries asporées qui ont été peu étudiées, des Spirilles qui ne paraissent pas devoir être rangées au point de vue systématique parmi les Bactériacées, il y a tout lieu de supposer que les Bactéries endosporées n'offrent pas toutes la même structure interne. Pour notre compte, nous pensons que la morphologie des Bactéries endosporées peut être classée suivant différentes catégories.

La Bactérie présente un noyau transitoire, auquel succède un véritable chromidium issu du noyau lui-même, qui entre en caryolyse. Ce cas s'observe avec une netteté particulière, une rigueur presque classique dans la Bactéridie charbonneuse. Le noyau offre ici l'aspect d'un gros granule, dense, homogène, à contours admirablement définis et prenant avec avidité les colorants nucléaires. Les observations de Wager, de Trambusti et Galeotti, de Schaudinn sur *Bacillus Bütschlii* sont particulièrement convaincantes. Celles de Schaudinn, en particulier, sont pleines d'intérêt. Cet auteur signale en effet dans la grosse Bactérie qu'il a examinée, chez les cellules jeunes, issues du développement de la spore, deux petits granules polaires qui ne sont pas mis en évidence sur les préparations vitales, mais qui apparaissent avec netteté sur les préparations fixées et colorées. Cet organite essentiellement transitoire disparaît rapidement et n'est plus perceptible dans les bâtonnets adultes. Il existe ici une différence avec le bacille du charbon, c'est que le grain nucléaire observé, et que l'auteur n'interprète pas, existe concu-

remment avec le réticulum basophile et qu'on ne peut retrouver comme dans *Bacillus anthracis*, l'évolution du noyau vers le chromidium. Dans *Bacillus butschlii* ces deux formations coexistent donc au lieu d'être successives. Matruchot et Molliard décrivent dans *Stichococcus bacillaris* un noyau d'abord parfaitement caractérisé qui paraît ensuite évoluer vers le chromidium. Karel Kruis et Rayman observent dans les Bacilles qu'ils ont étudié, d'abord un ou deux noyaux circulaires et nets contenus dans un protoplasme dense, puis notent ensuite un cytoplasme alvéolaire. Mencl, dans les *Cladothrix*, admet le polymorphisme bactérien et constate qu'un noyau bien caractérisé peut, chez ces organismes, évoluer vers un chromidium. De son côté, Swellengrebel dans un Bacille, *Bacterium binucleatum*, dans *Calothrix fusca* et *Sphaerotilus natans*, des Cyanophycées; Perrin, dans *Tripanosoma balbiani*, Petschenko, dans *Bacillopsis stylopygæ*, Høelling, dans un bacille de *Fusiformis termitidis*, Amato, dans les Bacilles de la pomme de terre et subtil, décrivent des aspects sensiblement identiques.

a) Ainsi donc, dans un premier mécanisme morphologique, les Bactéries endosporées peuvent présenter un noyau, coexistant avec le réticulum basophile pendant les premières heures du développement (observation de Schaudinn sur *Bacillus Bültschlii*, nos observations sur *Bacillus mycoides*).

b) Dans un deuxième mécanisme, les Bactéries endosporées présentent un noyau volumineux et dense, donnant naissance à un réticulum basophile diffus ou système nucléaire central de remplacement, idiochromidium duquel naîtra la spore (*Bacillus anthracis*).

c) Il est également possible, chez ces organismes, d'observer la coexistence du noyau pendant toute la durée du développement bactérien avec la formation basophile qui évolue (*Bacillus megatherium*) et qui doit être assimilée à une espèce de chromidium ou plutôt de formation mitochondriale, mécanisme de régulation qui permet peut être au noyau de se délester d'une partie de sa chromatine, afin que la Kernplasmarelation soit satisfaite. Dans ce cas, la spore provient directement du noyau, observation qui est conforme à celle de Kunstler sur *Bacteriodomonas sporifera*.

d) Enfin, nous ne nions pas absolument qu'il puisse exister chez certaines Bactéries une formation chromidiale unique, ainsi que les

recherches de Guilliermond et de Schaudinn, les travaux d'Ambroz et de Dobbel, ceux de Swellengrebel semblent l'attester.

D'après nos conceptions sur la structure des Bactéries endosporées, nous pensons que tous ces cas particuliers peuvent être ramenés à un seul.

Il y aurait d'abord chez les Bactéries endosporées une formation nucléaire, à laquelle succède une formation chromidiale.

La nucléose pourra être excessivement transitoire comme dans *Bacillus butschlii* où l'organite nucléaire est en voie de disparition. Ce noyau pourrait même disparaître complètement auquel cas le chromidium subsiste seul (théorie de Schaudinn et de Guilliermond). Souvent cependant le noyau apparaîtra sous forme d'un grain admirablement défini, comme dans *Bacillus anthracis*, puis évoluera ensuite. Enfin, pendant toute la durée du développement, organite nucléaire et formation chromidiale pourront coexister (*Bacillus Megatherium*).

Quant à la place qu'occupent les Bactéries endosporées dans la systématique, nous sommes encore très peu fixé à cet égard. Il nous semble qu'elles constituent un groupement très hétérogène, que leur polymorphisme est considérable, certaines pourraient être rapprochées des champignons Ascomycètes, *Bacillus Gammari*, d'autres ont des points de commun avec les Cyanophycées (*Sphaerotilus natans*) quelques-unes tendent vers les Protozoaires (*Bacillus Bütschlii*). Peut-être que des Bactéries s'irradient les êtres monocellulaires, animaux ou végétaux, plus élevés en organisation ?

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° Dans ce travail, nous avons indiqué un certain nombre de liquides fixateurs à point de congélation évoluant aux environs de $-0^{\circ}7$ et qui, par suite, sont moins brutaux que les fixateurs habituellement employés en histologie.

2° Nous avons montré l'impérieuse nécessité qu'il y avait à se servir, en cytologie microbienne, de plusieurs fixateurs et de teintures nucléaires différentes.

3° En vue de vérifier les récents travaux de Wager qui distinguait dans les levures deux formations nucléaires, nous avons entrepris l'étude d'*Endomyces albicans*; dans les deux formations de Wager, nous reconnaissons notre organite nucléaire et notre vacuole à corpuscules métachromatiques, alors que Wager assimilait à tort, la première de ces formations à un nucléole et la seconde à une vésicule nucléaire. Nos résultats corroborent les recherches anciennes de Guilliermond relatives à la structure des levures et infirment celles de l'auteur anglais entachées d'erreur.

4° Nous avons apporté une contribution à la genèse, la physiologie et la microchimie des corpuscules métachromatiques (*Endomyces albicans*).

5° Nous avons également apporté une contribution à l'étude de la formation basophile d'*Endomyces albicans*, à sa genèse, à ses caractères de coloration. En dépit de recherches de Kohl et de Guilliermond, effectuées il est vrai sur des levûres, nous persistons à admettre que cette formation n'est pas constituée par un ensemble de granulations, réparties aux nœuds du réticulum cytoplasmique, mais qu'elle est constituée par un véritable réseau basophile diffus indépendant, comme le démontrent l'action de certains fixateurs qui produisent une rétraction complète de ce réticulum, et surtout l'évolution de

cette formation au cours du développement, ses rapports avec le noyau, sa participation dans le bourgeonnement.

6° Dans une étude minutieuse de *Bacillus Anthraxis*, nous avons démontré que chez cet organisme il existe un noyau bien défini, morphologiquement et chromatiquement, se divisant par une amitose spéciale et engendrant une formation chromidiale (Idiochromidium) qui donnera finalement naissance à la spore.

Nous avons également suivi l'évolution des corpuscules métachromatiques dans le bacille, évolution qui passe par deux maxima. Nous attribuons à ces corpuscules, aussi bien dans ce cas, que dans les exemples précédents, un rôle de substances de réserve, nous rattachant ainsi à l'hypothèse, aujourd'hui généralement admise.

7° Nous avons mis en évidence dans *Bacillus megatherium* un organite nucléaire, constant à tous les stades du développement existant concurremment avec une formation basophile diffuse qui pourrait être considérée, à certains points de vue, comme une véritable formation mitochondriale. Le noyau et la formation basophile interviennent tous deux dans l'édification de la spore.

8° Nous avons décrit le développement partiel de *Bacillus mycoides* (stade jeune) et terminons notre travail par une hypothèse relative à la structure des Bactéries endosporées et à leur place dans la Systématique.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

A. — BIBLIOGRAPHIE DES LEVURES

- [1] GUILLIERMOND. — Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. (Storck, Lyon, 1902. — Paris, th. doctorat ès-sciences nat.)
- [2] GUILLIERMOND. — *Revue Générale de Botanique*, 1903 (résumé).
- [3] GUILLIERMOND. — Sur le noyau de la levure. (*Ann. Mycol.*, t. II, n° 2. 1904.)
- [4] GUILLIERMOND. — Recherches cytologiques et taxonomiques sur les Endomycétées. (*Revue Générale de Botanique*, t. XXI, 8 pl., 1909.)
- [5] GUILLIERMOND. — Remarques sur Endomyces fibuliger. (*C. R. Société Biologie*, 1910.)
- [6] GUILLIERMOND. — Nouvelles observations sur la cytologie des levures. (*C. R. Ac. des Sciences*, 1910.)
- [7] GUILLIERMOND. — Remarques critiques sur différentes publications parues récemment sur la cytologie des levures et quelques observations nouvelles sur la structure de ces champignons. (*Centr. für. Bakt.*, Abt. II, t. LXXVI, 1910.)
- [8] FUHRMANN. — Die Kerntheilung von Sacch. ellipsoideus I, Hansen, bei der Sprossbildung. (*Centr. für Bakt.* Abt. II, Bd XV, 1905.)
- [8 bis] HIRSCHBRUCH. — Die Fortpflanzung der Hefen. *Centr. für Bakt.*, t. IX, 1902. Abt. II. — Die Fortpflanzung der Hefezelle. (*Centr. für Bakt.*, t. IX, 1902, Abt. II.)
- [9] JANSSENS et MERTENS. — Etude microchimique et cytologique d'une torula rose. (*La Cellule*, t. XX, 1903.)
- [10] JANSSENS. — A propos du noyau de la levure. (*La Cellule*, t. XX, 1903.)
- [11] F.-G. KOHL. — Ueber das Glycogen und einige Erscheinungen bei der sporulation der Hefe. (*Ber. der deutsch. Bot. Gesell.*, f. 2, 1907.)

- [12] F.-G. KOHL. — Die Hefepilze. — (Quelle et Meyer, Leipzig, 1908.)
- [13] D. OTTOLENGHI. — Ueber die feinere struktur der Hefen. (*Centr. für Bakt. Abt. II*, t. XXV, 1909).
- [14] SWELLENGREBEL. — Sur la division nucléaire de la levure pressée. (*Ann. Inst. Past.*, t. XIX, 1905).
- [15] WAGER and PENISTON. — Cytological observation on the Yeast plant. (*Annals of Botany*, 1910.)

Des difficultés matérielles nous ont empêché de donner à ces chapitres toute l'importance qu'ils comportent.

B. — BIBLIOGRAPHIE DES CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES

- [1] BABÈS. — Congrès international d'hygiène, 1887.
- [2] BABÈS. — Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen. (*Zeitschr. für Hygien.*, Bd XX, 1895).
- [3] BUNGE. — Ueber Sporenbildung bei Bakterien (Fortsch. d. med., 1895).
- [4] BÜTSCHLI. — Weitere Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien, (Leipzig, 1896).
- [5] CRATO. — Die Physode. (*Ber. der. deutsch. bot. Gesel.*, Bd X. Heft. 6).
- [6] ERNST. — Ueber Kern und sporenbildung in Bakterien. (*Zeitsch. für Hyg. und Infektund k.*, 1889, Bd V).
- [7] ERNST. — Ueber den Bau der Bakterien. (*Centralblatt für Bakt.*, Abt. II, Bd VIII, 1902).
- [8] FANTHAM AND PORTER. — (*Centralblatt für Bakt.*, 1909).
- [9] GRIMME. — (*Centralblatt für Bakteriologie*, Bd XXXII, 1902).
- [10] GUILLIERMOND. — (*C. R. Ac. des Sciences*, 1901).
- [11] GUILLIERMOND. — Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à forme levures. (Storck., Lyon, 1902).
- [12] GUILLIERMOND. — Sur la présence des corpuscules métachromatiques dans les Bactéries. (*Lyon Médical*, juillet 1902).
- [13] GUILLIERMOND. — A propos de la communication de M. Behring au Congrès de la Tuberculose. (*Lyon Médical*, octobre 1905).
- [14] GUILLIERMOND. — Sur les grains de sécrétion des Cyanophycées. (*C. R. Société Biologie*, 1905).
- [15] GUILLIERMOND. — Etude cytologique des Cyanophycées. (*Rev. gén. de Botanique*, t. XVIII, 1906).
- [16] GUILLIERMOND. — Observations cytologiques sur la germination des graines de Graminées. (*C. R. Ac. des Sciences*, 1906).
- [17] GUILLIERMOND et BEAUVERIE. — Note préliminaire sur les globoides et certaines granulations des graines ressemblant par quelques-unes de leurs propriétés aux corp. métachrom. (*C. R. Ac. des Sc.*, 1906).

- [18] GUILLIERMOND. — Nouvelles recherches sur la cytologie des graines de Graminées. (*C. R. Ac. des Sc.*; 1907).
 - [19] GUILLIERMOND et MAWAS. — Caractères histochimiques des granulations des Mastze en et rapport de ces corps avec la vultine des protistes. (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXIV, 1908).
 - [20] GUILLIERMOND. — A propos des corpuscules métachromatiques ou grains de vultine. (*Archiv für Protistenk.*, Bd XIV, 1910).
 - [21] HAMBÜRGER. — Zur Kentniss der Dunaleilla salina und einer Amöbe aus Salinenwasser von Cagliari. (*Arch. für Protistenk.*, 1905).
 - [22] KROMPECHER. — Présence des corpusc. métachr. dans les Bactéries à spores. (*Centralb. für Bakt.*, 1901).
 - [23] KUNSTLER et BUSQUET. — Recherches sur les grains rouges. (*C. R. Ac. des Sciences*, 1987, t. 128).
 - [24] LAUTERBORN. — Untersuchungen über Bau, Kerntheilung und Bewegung der Diatomeen, (Leipzig, 1896.)
 - [25] MAIRE. — (*Annales mycologici*, 1903).
 - [26] MARX et WOITHE. — Ein Verfahren zur virulenz Bestimmung der Bakterien. (*Centralb. für Bakt.*, 1901).
 - [27] MATRUCHOT et MOLLIARD. — Variations de culture sous l'influence du milieu de Stichococcus bacillaris. (*Revue générale de Botanique*, T. XIV, 1902).
 - [28] A. MEYER. — Praktikum der botanischen Bakterienkunde. (Iéna, G. Fischer, 1903).
 - [29] A. MEYER. — Untersuchungen über Verbreitung, morphologie und Chemie des vultins, (*Botanische Zeitung*, 1904).
 - [30] REICHENOW. — Arbeit a.d. Gesundheitsamt, Bd. 33, Heft 1, 1909.
 - [31] SWELLENGREBEL. — La vultine chez les Trypanosomès. (*C. R. Soc. Biol.*, 1908).
 - [32] VILLARD. — Contribution à l'étude cytologique des Zoochlorelles. (*C. R., Ac. des Sc.*, 1903).
-

C. — BIBLIOGRAPHIE DES BACTÉRIES

- [1] AMATO. — Ueber die feinere struktur der Bakterien. (*Centr. für Bakt.*, Abt. I, Bd 48, 1908.)
- [2] AMBROZ. — Beitrag. zur Cytologie der Bakterien. (*Centr. für Bakt.*, Abt. I, Bd 51, 1909.)
- [3] BOSC. — Recherches sur la structure et l'appareil nucléaire des Trypanosomes. (*Archiv für Protist.*, T. V, 1905.)
- [4] BÜTSCHLI. — Weitere Ausführungen uber den Bau des Cyanophyceen und Bakterien, Leipzig, 1896. — Bemerkungen uber Cyanophyceen und Bakterien. (*Archiv für Protist.* Bd I, 1902.)
- [5] CALKINS. — Evidence of a sexual life cycle in the life history of *Amoeba proteus*. (*Archiv für Protist.*, T. V, 1905.)
- [6] CAULLERY et MESNIL. — Structure nucléaire de *Foettingeria actinarium*. (*C. R. Soc. Biol.*, 1903.)
- [7] DANGEARD. — Structure de *Chromatium Okenii*. (*Bull. soc. Bol. de France*, T. LVI, 1909.)
- [8] DOBBELL. C. — Notes on some parasitic Protists. (*Quart. Journ. of Microg.*, 1908, T. LII.)
- [9] DOBBELL. C. — On the socalled method of spore formation in the disporic Bacteria. (*Quart. Journ. of Microg. Sc.*, T. LIII, 1909.)
- [10] DOBBELL. C. — Some observations on the Infusorian Parasitic in Cephalopoda. (*Quart. Journ. of Microg. Sc.*)
- [11] DOBELL. C. — Chromidia and the binuclearity hypothesis. (*Quart. Journ. of Micrograph. Sc.*, 1908-09.)
- [12] ERNST. — Ueber den Bau der Bakterien. (*Centralblatt für Bakt.*, 1902, t. VIII.)
- [13] FANTHAM. — The chromatine masses of *Piroplasma bigeminum*. (*Quart. Journ. of Microg. Sc.*, 1907.)
- [14] FAURÉ-FRÉMIET. — Etudes sur les mitochondries des Protozoaires et des cellules sexuelles. (*Arch. Anat. Microscop.*, t. XI, 1909.)
- [15] FEDEROWITSCH. — Ueber die Körnigkeit der Bakterien. (*Central. für Bakt.*, Abt II, Bd 8, 1902.)
- [16] GEORGEVITCH. — Note préliminaire sur la formation et la germination des spores dans *Bac. thermoph. Jivoïni*. (*C. R. Soc. Biol.*, LXVII, 1910.)

- [17] GONDER. — Beiträge zur Kenntniss der Kernverhältnisse bei den, in Cephalopoden sehmarotzenden Infusorien. (*Archiv für Prot.*, T. V, 1905).
- [18] GUILLIERMOND. — L'appareil chromidial des Cyanophycées et sa division. (*C. R. Ac. des Sc.*, 1905. — *C. R. Soc. Biol.*, 1905).
- [19-20] GUILLIERMOND. — Contribution à l'étude cytologique des Bactéries. (*C. R. Ac. des Sc.*, 1906. — *C. R. Soc. Biol.*, 1907).
- [21] GUILLIERMOND. — Contribution à l'étude cytologique des Bacilles endospores. (*Archiv für Protist.*, Bd XII, 1908).
- [22] GUILLIERMOND. — A propos de la structure des Bacilles endospores (Réponse à M. Mencl). (*Archiv für Protist.*, Bd XIX, 1910).
- [23] HERTWIG. — (*Archiv für Protist.*, 1902, T. I).
- [24] HERTWIG. — Kerntheil, Richtungs Körperbild und Befruchtung von Actinosphaerium. (Abh. k. Bay. Akad. Wiss., XIX, 2).
- [25] HERTWIG. — Ueber den Chromidialapparat und den Dualismus der Kernsubstanz (*Sitz. bei. Gesellsch. für Morphol. und Physiologie. München.*, 1907).
- [26] HERTWIG. — Ueber neue Probleme der Zellenlehre. (*Archiv für Zellforschung.*, T. I^{er}, 1908).
- [27] HÖLLING. — Die Kernverhältnisse von Fusiformis termitidis. (*Arch. für Protist.*, Bd 1910).
- [28] HUEPPE. — Methoden der Bakterien forschung. (*Fortsch. der Méd.*, V, 1891).
- [29] KLEBS. — Allgemeine Pathologie, Bd I, 1887.
- [30] KAREL KRUIS und BOHNSLAW RAYMAN. — Des noyaux des Bactéries. (*Bulletin international de l'Ac. des Sc. de Bohême*, 1904).
- [31] KUNSTLER et GINESTE. — Note sur un Spirille. (Congrès des Anatomistes, Toulouse, avril 1904).
- [32] KUNSTLER et GINESTE. — Contribution à la morphologie générale des Protozoaires supérieurs. (*C. R. Ac. des Sc.*, 1906, t. 142).
- [33] KUNSTLER et BUSQUET. — Sur la valeur nucléaire du corps central des Bactériacées. (*C. R. Ac. des Sc.*, 1897, T. CXXV).
- [34] KUNSTLER. — Remarques sur certains points de l'histoire de la vie des organismes inférieurs. (*C. R. Ac. des Sc.*, 1900, T. CXXX).
- [35] MATRUCHOT et MOLLIARD. — Variation sous l'influence du milieu de la structure de Stichococcus bacillaris. (*Rev. gén. Bot.*, T. XIV, 1902).
- [36] MENCL. — Einige Beobachtungen uber die struktur und sporenbildung bei symbiotischen Bakterien. (*Centr. für Bakt.*, Abt. II, Bd XII, 1904).

- [37] MENCL. — Cytologisches über die Bakterien der Prager Wasserleitung. (*Centralb. für Bakt.*, Abt. II, Bd XV, 1905).
- [38] MENCL. — Eine Bemerkung zur Organisation der Periplaneta Symbionten. (*Archiv für Protistenk.*, T. X, 1907).
- [39] MENCL. — Noyaux des Bactéries et cloisons transversales de GUILLIERMOND. (*Arch. für Protistenk.*, 1909.)
- [40] MESNIL. — Chromidies et questions connexes. (*Bulletin Inst. Past.*, T. III, 1905).
- [41] MEYER. — Die Zellkern der Bakterien (*Flora*, T. XCVIII, 1908).
- [42] MEYER. — Studien über die Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Bakterien, Ausgeführt an *Astasia asterospora* und *Bacillus tumescens*. (*Flora*, T. 84, 1897).
- [44] NAKANISCHI. — Ueber den Bau der Bakterien. (*Central. für Bakteriologie*, Abt. I, T. XXX, 1901).
- [45] PERRIN. — Life history of *Trypanosoma Balbiani*. (*Archiv. für Protistenk.*, Bd VII, 1906.)
- [46] PETSCHENKO. — Sur la structure et le cycle évolutif de *Bac. stylopygæ*. (*Bull. Ac. des Sc. Cracovie*, 1908).
- [47] POPOFF. — Experimentelle Zellstudien. (*Archiv für Zellforschung*, T. I, 1908).
- [47 bis] PREISZ. — Studien über die Morphologie und Biologie des Milzbrand *Bacillus*. (*Central. für Bakt.*, Abt. I, T. XXXV, 1904).
- [48] PROTOPOPOFF. — Sur la question de la structure des Bactéries. (*Ann. Inst. Past.*, T. V, 1891).
- [49] RUDZICKA, V. — Weitere Untersuchungen über den Bau und die allgemein biologische Natur der Bakterien. (*Archiv für Hygien.*, 1903, 1904, 1908.)
- [50] RUDZICKA, V. — Die Cytologie über sporenbildenden Bakterien und ihr Verhältniss zur Chromidienlhre. (*Centr. für Bakt.*, Abt. II, T. XXIII, 1909).
- [51] SCHAUDINN. — Beiträge zur Kenntniss der Bakterien und verwandter Organismen. (*Archiv für Protistenk.*, Bd I, 1902; Bd II, 1903).
- [52] SJÖBRING. — Über Kerne und Teilungen bei Bakterien. (*Centr. für Bakt.*, Abt. I, Bd XI, 1892).
- [53] SWELLENGREBEL. — Zur Kenntniss der Cytologie des Bakterium binucleatum. (*Centr. für Bakt.*, Abt. II, T. XIX, 1907).
- [54] SWELLENGREBEL. — Sur la cytologie comparée des Spirochètes et des Spirilles. (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXII, 1907).
- [55] SWELLENGREBEL. — Zur Kenntniss der Cytologie von *Bacillus maximus buccalis*. (*Centr. für Bakt.*, Abt. II, T. XVI, 1906.).

- [56] SWELLENGREBEL. — Sur la cytologie de *Sphærotilus natans*. (*C. R. Soc. Biol.*, juillet 1908, T. LXV.)
 - [57] TRAMBUSTI et GALEOTTI. — Neuer Beitrag zum Studium der inneren struktur der Bakterien. (*Centr. für Bakt.*, Abt. I, T. XI, 1892.)
 - [58] VEJDOVSKY. — Bemerkungen über den Bau und Entwicklung der Bakterien. (*Centrabl. für Bakt.* Abt. II, T. VI, 1900.)
 - [59] VEJDOVSKY. — Über den Kern der Bakterien und seine Teilung. (*Centralblatt für Bakt.*, Abt. II, T. XI, 1904.)
 - [60] WAGER. — On a nuclear structure in the Bacteria. (*Annals of Botany*, T. V, 1891.)
 - [61] ZETTNOW. — Ueber Swellengrebels Chromatin bänder in *Spirillum volutans*. (*Centralblatt für Bakt.*, Abt. I, T. XLVI.)
-

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE 1. — ENDOMYCES ALBICANS (formes levures)

N°	FIXATION	COLORATION	JOUR	MILIEU	FORMATIONS DÉCÉLÉES
0	0	Vitale rouge neutre	6	Carotte	Corpusc. métachromat.
1, 2, 4	0	» »	2	»	» »
3	0	» »	3	»	» »
[5-7]	Lavdowsky	Laque ferrique éosine	6	»	Formation basophile
8	Bouin	» »	4	»	Form. bas. et C. M.
9	»	» »	5	Betterave	Formation basophile
10, 22	Alcool	» »	5	Carotte	Formation basophile rétractée
34	»	» »	6	»	
43, 44, 45	»	» »	3	»	Formation basophile
21	Lavdowsky	» »	6	»	
[11-16]	Alcool	Hématéine éosine	2	Pomme de terre	Noyau et C. M.
[17-20]	Perenyi	» »	6	Carotte	Noyau
[23-27]	Alcool	Bleu de Unna	1	Pomme de terre	Form. basop. rétractée
28	Bouin	» »	3	Carotte	C. M.
[29-31]	Lavdowsky	» »	3	»	C. M.
[32, 33]	»	» »	6	»	C. M. dissous
35-39	Bouin	» »	6	»	Formation basophile
[36-38]	Perenyi	» »	3	Pomme de terre	Noyau
[40-42]	Lavdowsky	Hématéine éosine	4	Carotte	C. M. et noyau

PLANCHES 2 et 3. — **ENDOMYCES ALBICANS** (formes filamenteuses)

CULTURE SUR GÉLOSE SACCHAROSÉE

N°	FIXATION	COLORATION	JOUR	FORMATIONS DÉCELÉES
1, 2	0	Rouge neutre	1	Corpuscules métachromatiques
3, 4, 5	0	»	3	Corpuscules métachromatiques et noyau
[6-9]	0	»	6	Corpuscules métachrom. dissous, noyau
10, 11	Perenyi	Laque ferrique éosine	2	Formation basophile et C. M. en 10
12	Formol acétique	» »	4	» »
13	Perenyi	» »	2	Noyau
14	Formol acétique	» »	4	»
15, 16	» »	» »	7	Formation basophile
[17-19]	Bouin	» »	7	» »
20	»	» »	2	» »
21, 26	Perenyi	» »	2	» »
22, 24	Bouin	» »	4	» »
23	Formol acétique	» »	7	» »
25, 27	Alcool	» »	4	Formation basophile rétractée
[28-32]	»	Bleu Unna	2-7	Formation basoph. rétractée, C. M. noyau
[33-36]	Bouin	»	2	C. M. et formation basophile
37, 38	»	»	4	C. M. et noyau
39-45	Perenyi	»	7	Noyau et formation basophile
[46-54]	»	Hématéine éosine	2-4	Noyau
[55-58]	Bouin	» »	2	Noyau et C. M.
[59-62]	»	» »	4	Noyau et C. M.
[63-67]	Alcool	Violet gentiane	2	Noyau, C. M. et formation basophile rétractée
[68-72]				

PLANCHES 4 et 5. — **BACILLUS ANTHRACIS***CULTURE SUR GÉLOSE*

N°	FIXATION	COLORATION	HEURE	STADE	FORMATIONS DÉCELÉES
[1-4]	Perenyi	Laque ferrique éosine	6	1	Trainées nucléaires C. M.
[5-8]	Lavdowsky	Bleu de Unna	6	1	
[9-16]	Sublimé alcoolique	Laque ferrique éosine	12	2	Noyau vésiculeux
[17-20]	Perenyi	» »	19-24	3 (a)	Noyau vésiculeux évoluant vers le noyau plein
21	Sublimé alcoolique	» »	19-24	3 (a)	
[22-25]	Perenyi	» »	19-24	3 (a)	Noyau plein
[26-28]	»	Hématéine éosine	24	3 (b)	»
[29-31]	»	Laque ferrique éosine	24	3 (b)	»
32, 33	»	Bleu de Unna	24	3 (b)	»
34, 35	»	Safranine	24	3 (b)	»
[37-40]	»	Violet de gentiane	24	3 (b)	»
36	Lavdowsky	Bleu de Unna	24	3 (b)	Corpusc. métachromatiques
[41-43]	»	Laque ferrique éosine	36	4 (a)	Noyau diffus
44, 45	Perenyi	» »	36	4 (a)	» caryolyse du noyau plein
46, 47	»	Bleu de Unna	36	4 (a)	» stade de transition
48, 49	»	Hématéine éosine	36	4 (a)	» cellule bulleuse
50	»	Violet de gentiane	36	4 (a)	Noyau diffus
51, 52	Lavdowsky	Laque ferrique éosine	48	4 (b)	»
53, 54	Perenyi	» »	48	4 (b)	»
55, 56	»	Hématéine éosine	48	4 (b)	»
57	Lavdowsky	» »	48	4 (b)	» et C. M.
60, 61	»	Bleu de Unna	48	4 (b)	» »
58, 59	Perenyi	»	84	4 (b)	Noyau diffus
[62-65]	»	Laque ferrique éosine	66-78	5	Sporogénèse
[66-68]	»	Bleu de Unna	66-78	5	»
[69-71]	»	Violet de gentiane	66-78	5	»
[72-75]	»	Laque ferrique éosine	84	6	Spore
[76-78]	»	Bleu de Unna	84	6	»
79, 80	»	Violet de gentiane	84	6	»

PLANCHES 6 et 7. — BACILLUS MEGATHERIUM
CULTURE SUR GÉLOSE

N°	FIXATION	COLORATION	HEURE	STADE	FORMATIONS DÉCELÉES
1-4, 34	Lavdowsky	Bleu de Unna	36	1	C. M. indifférenciation cellulaire.
[5-9]	Perenyi	»	36	1	Noyau
[10-14]	»	Laque ferrique éosine	36	2	»
[15-16]	Lavdowsky	» »	36	2	»
[17-19]	Perenyi	Safranine	36	2	»
[20-22]	»	Hématéine éosine	36	2	»
23	Lavdowsky	» »	36	1	C. M. indifférenciation cellulaire.
[24-33]	Perenyi	Violet de gentiane	36	2	Noyau et formation basophile condensée
33-36	»	Bleu de Unna	62	3	Noyau
[37-39]	»	Safranine	62	3	Noyau et formation basophile diffuse
[40-42]	»	Hématéine éosine	62	3	Noyau
43, 44	»	Laque ferrique éosine	62	3	Noyau et form. basop. diffuse
45, 46	Lavdowsky	» »	62	3	» » »
[47-49]	Perenyi	Violet de gentiane	62	3	» » »
50	»	Bleu de Unna	62	4	Sporogénèse et noyau condensé
52	»	»	62	4	» » »
53, 54	»	Safranine	62	4	Sporogénèse
[57-59]	»	Hématéine éosine	62	4	»
[61-63]	»	Laque ferrique éosine	62	4	»
69, 70, 74	»	Violet de gentiane	62	4	»
51	»	Bleu de Unna	62	5	Spore
55-56	»	Safranine	62	5	»
60	»	Hématéine éosine	5 ^e jour	5	»
[64-68]	»	Laque ferrique éosine	»	5	»
[71-73]	»	Violet de gentiane	»	5	»

PLANCHE 8. — **BACILLUS MYCOIDES***CULTURE SUR GÉLOSE*

N°	FIXATION	COLORATION	HEURE	FORMATIONS DÉCELÉES
1	Zenker	Laque ferrique éosine	24	Formation basophile
2	Alcool	» »	24	Noyau et format. basop.
[3-8]	Perenyi	» »	24	» »
[9-12]	Zenker	» »	24	Noyau
[13-15]	Alcool	» »	24	Formation basophile
16	Zenker	» »	24	» »
[17-20]	Lavdowsky	Bleu de Unna	2.0	Corpusc. métachromat.

Dessins effectués avec l'objectif à immersion au 1/18 et l'oculaire compensateur 9 (Stiassnie).

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

PHYSIOLOGIE. — L'Ergastoplasme et les formations
mitochondriales.

MINÉRALOGIE. — Les gîtes cuprifères.

Vu et approuvé :

Paris, le 17 octobre 1911.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Paul APPELL.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

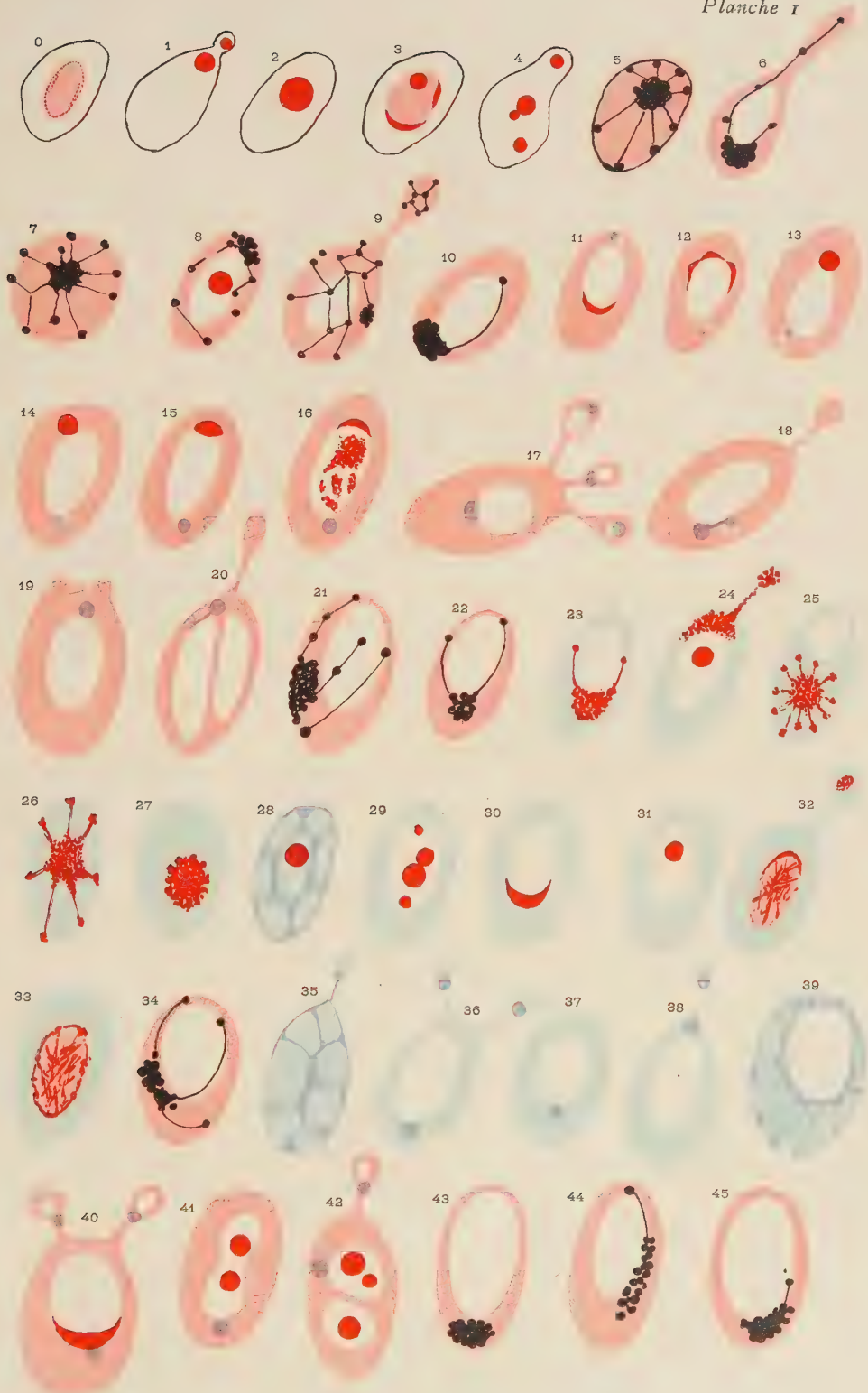
L. LIARD.

TABLE DES MATIÈRES

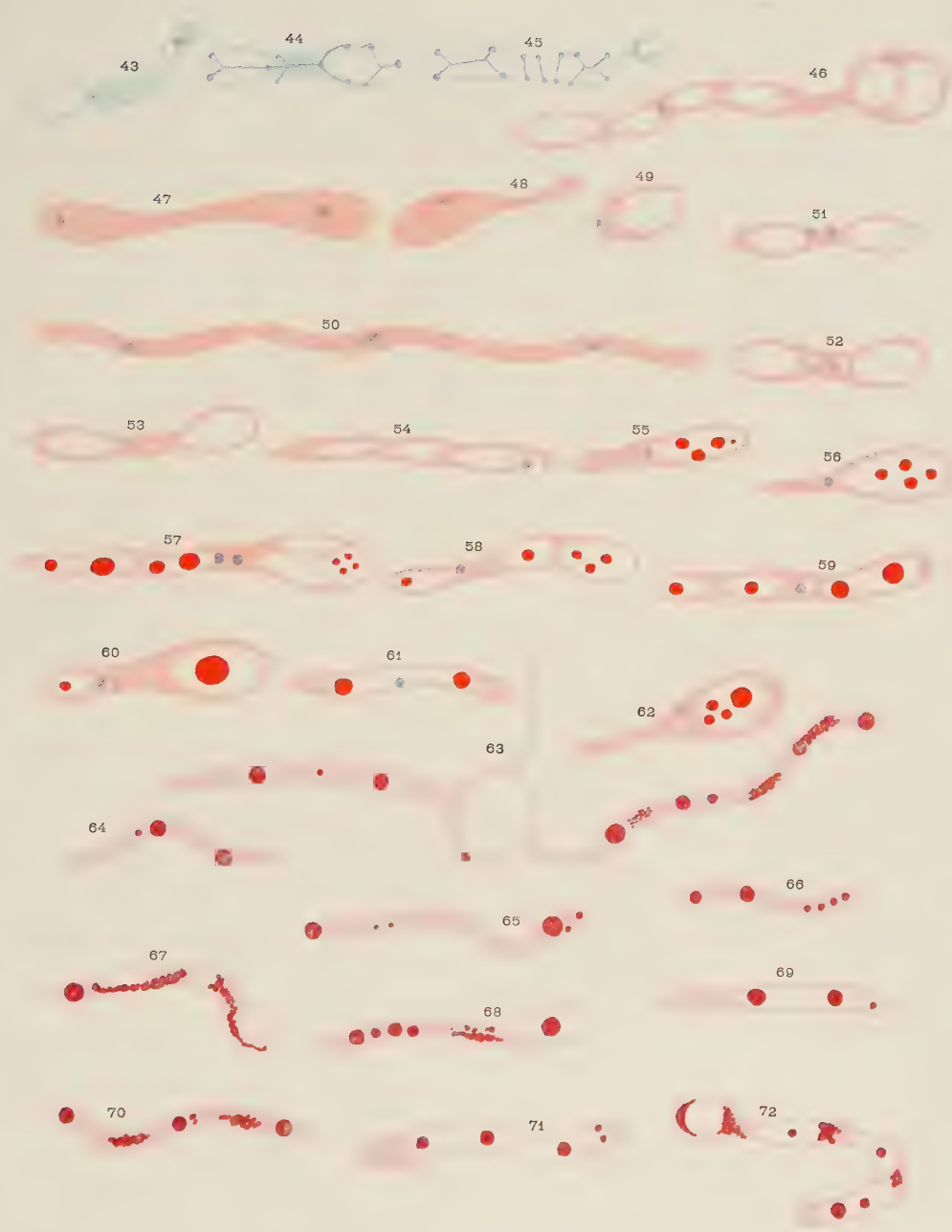
I. INTRODUCTION	3
II. ÉTUDE D'ENDOMYCES ALBICANS	6
I. Historique des levures	6
II. Techniques générales	11
<i>Collage</i>	11
<i>Fixation</i>	13
A) Fixateurs légèrement hypertoniques.	13
B) Fixateurs très fortement hypertoniques	15
<i>Colorations</i>	16
Colorations vitales	16
Colorations après fixation	17
Tableau des indications chromatiques . .	19
<i>Milieux de culture</i>	20
A) d'Endomyces	20
B) des Bactéries	21
III. Cytologie d'Endomyces (formes levures)	23
COLORATIONS VITALES	23
A) <i>Colorants naturels</i>	23
B) <i>Colorants synthétiques</i>	23
A) Rouge de Betterave	23
Colorant du safran	23
B) Bleu de méthylène.	24
Rouge neutre	24
Autres colorants vitaux.	26
PROTOPLASMA	26
<i>Produits accessoires</i>	26
A) Graisse	27
B) Glycogène	27
C) Oxydase	27

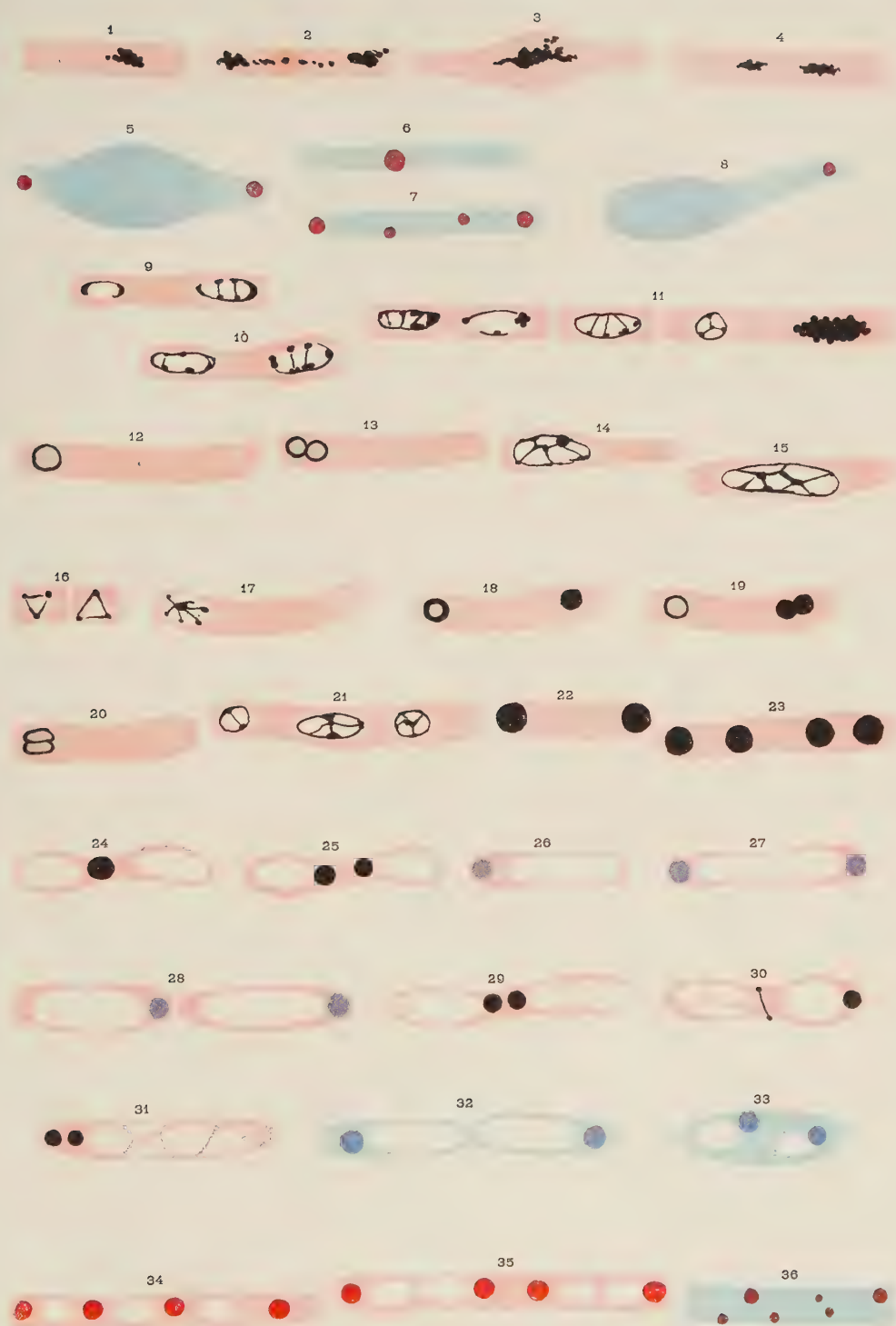
NOYAU.	28
<i>Fixation et coloration.</i>	28
<i>Position.</i>	29
Tableau des affinités chromatiques d'Endo- myces	30
<i>Structure.</i>	31
<i>Division</i>	31
CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES.	32
<i>Historique</i>	32
<i>Fixation et coloration</i>	37
<i>Description.</i>	37
<i>Genèse</i>	38
<i>Physiologie.</i>	39
a) Rapports avec grains de Toxigène	39
b) Les corpuscules métachromatiques sub- stances de réserves.	39
<i>Microchimie</i>	40
A) Microchimie proprement dite et jeu des phénomènes de Métachromasie	41
a) Phénomènes lumineux	40
b) Impuretés colorantes.	42
c) Acidité des corpuscules métachro- matiques	42
d) Changement de nature physique	43
B) Méthode soustractive	43
C) Méthode mixte (chromatique et chi- mique)	46
FORMATION BASOPHILE	46
<i>Introduction</i>	46
<i>Colorations.</i>	48
<i>Fixation</i>	48
<i>Morphologie</i>	49
<i>Nature.</i>	50
IV. Cytologie d'Endomyces (formes filamenteuses)	51
INTRODUCTION.	51
<i>Substrata</i>	51
<i>Techniques.</i>	52
Colorations vitales	52
Colorations après fixation	53

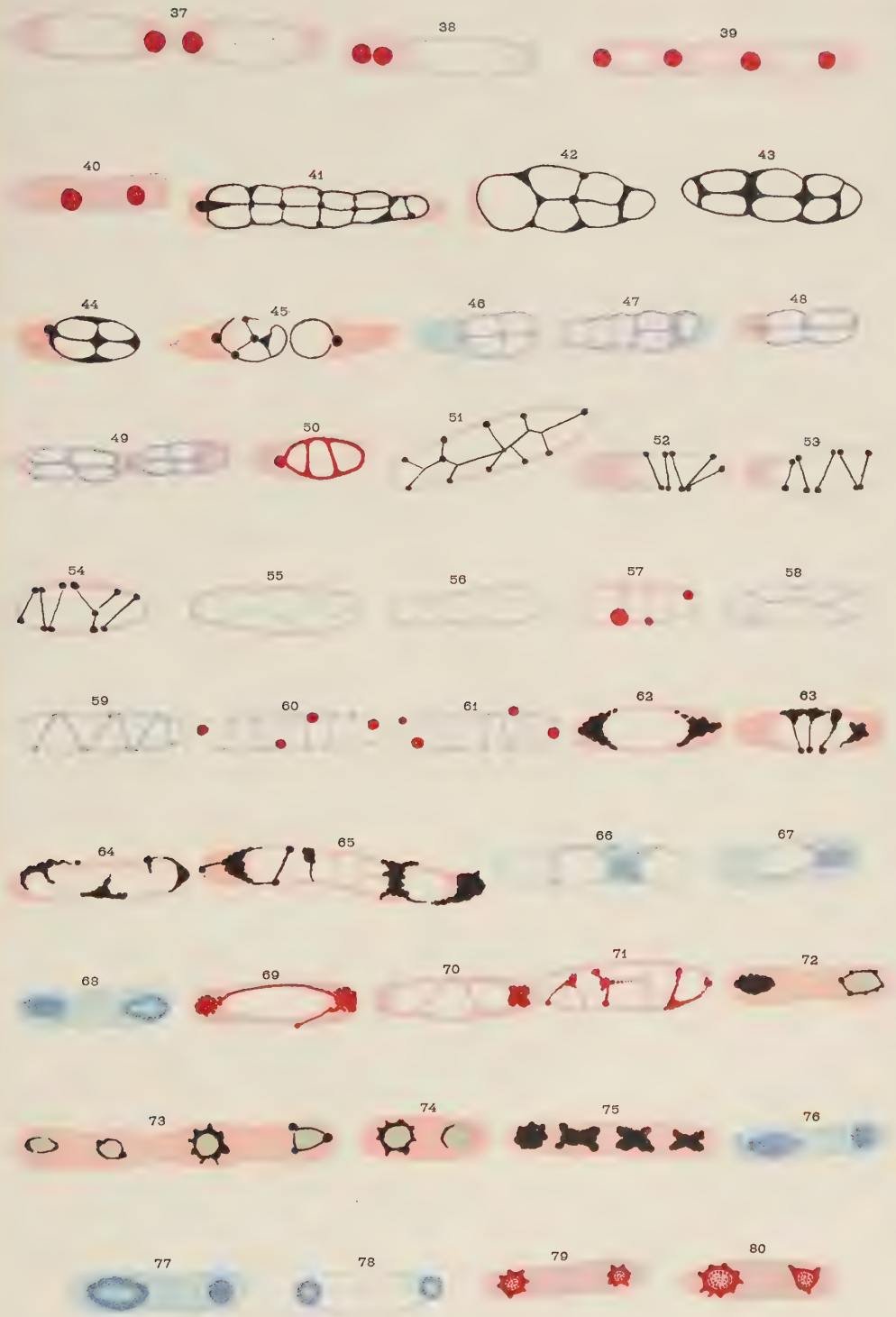
NOYAU.	54
CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES.	55
FORMATION BASOPHILE	56
III. ÉTUDE DES BACTÉRIES	58
I. Introduction	58
II. Historique	60
III. Bacillus anthracis.	72
<i>Techniques.</i>	72
<i>Evolution</i>	73
1 ^{er} stade : Indifférenciation cellulaire	73
2 ^e stade : Noyau vésiculeux	74
3 ^e stade : Noyau plein	74
4 ^e stade : Noyau diffus a)	76
5 ^e stade : Sporogenèse b)	79
6 ^e stade : Spore	80
IV. Bacillus megatherium	81
<i>Techniques.</i>	81
<i>Evolution</i>	82
1 ^{er} stade : Indifférenciation cellulaire	82
2 ^e stade : Nucléose et formation basophile condensée.	83
3 ^e stade : Nucléose et formation basophile diffuse.	86
4 ^e stade : Sporogenèse	87
5 ^e stade : Spore	87
V. Bacillus mycoides	89
VI. Conclusions.	91
IV. CONCLUSIONS GÉNÉRALES	94
V. INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	97
I. LEVURES	97
II. CORPUSCULES MÉTACHROMATIQUES	99
III. BACTÉRIACÉES.	101

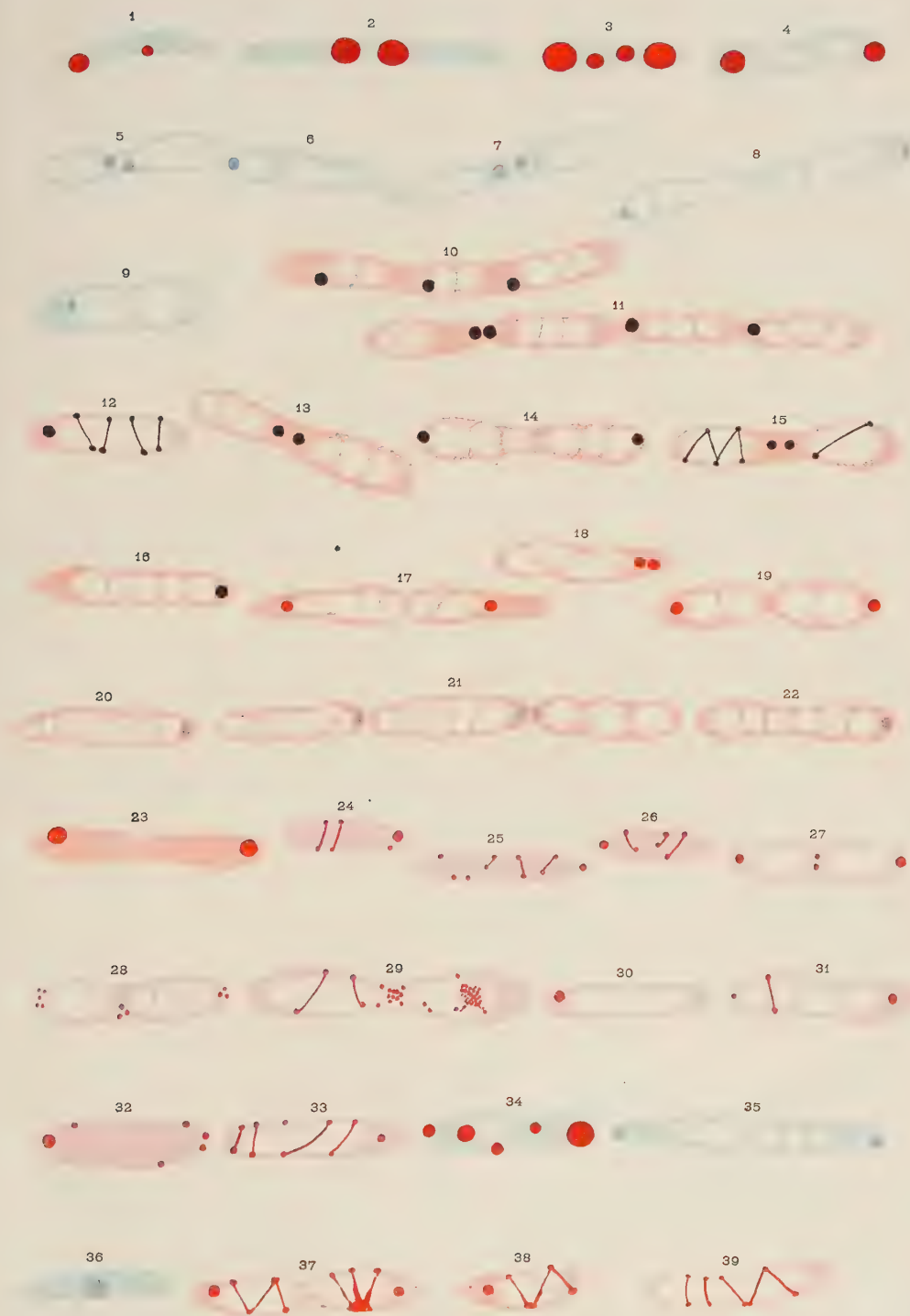


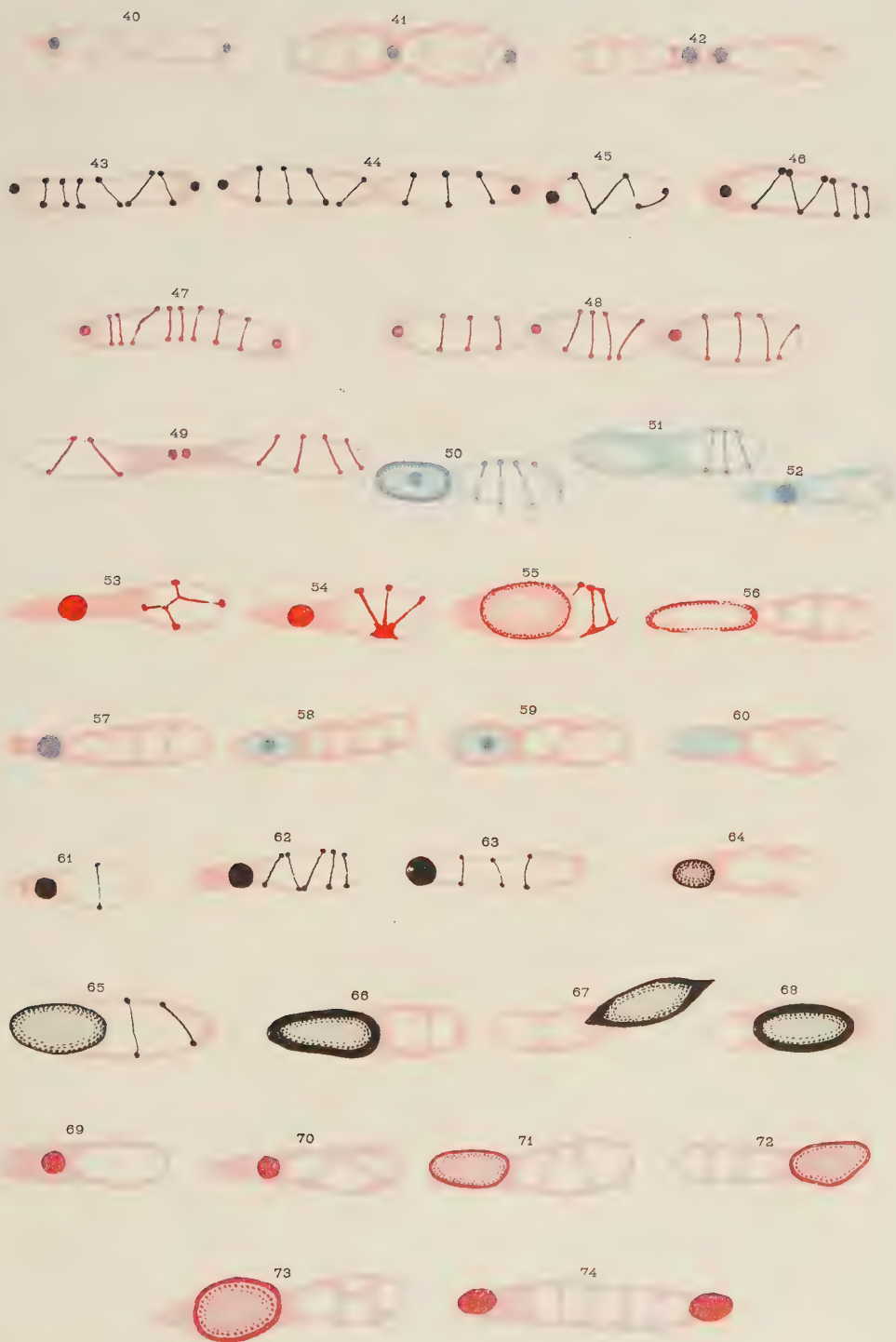


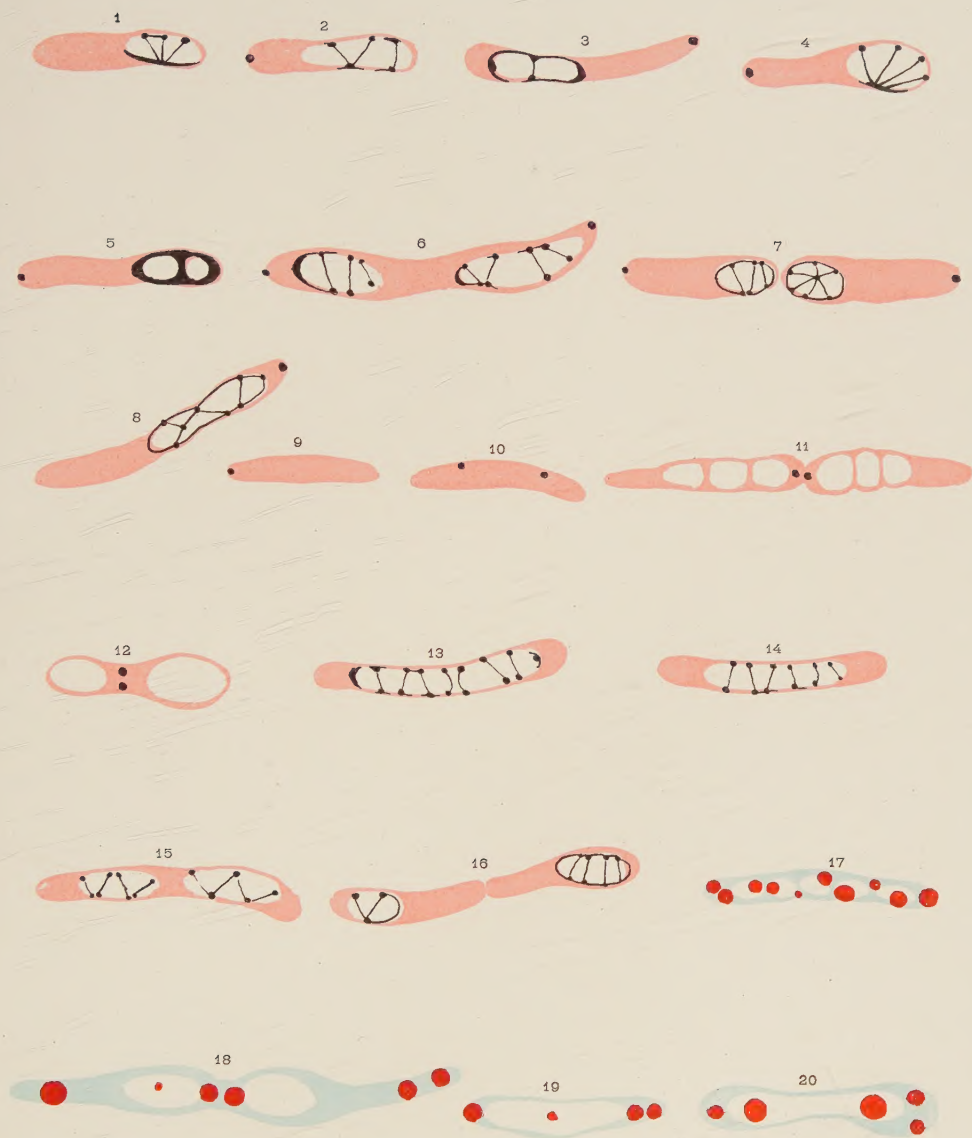












H. Pénau

Imp. Moderne, Agen

Bacillus mycoïdes

